

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut

Joana Jõgela

**ARC-LUM ÜHENDITE FOTOLUMINESTSENTSOMADUSTE
UURIMINE TAHKES POLÜMEERMAATRIKSIS**

Magistritöö

30 EAP

Juhendaja: teadur Erki Enkvist, PhD

Tartu 2017

Sisukord

Lühendid.....	4
1. Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1. Luminestsentskiirgus	7
2.2. Toatemperatuurne fosforescentskiirgus.....	8
2.2.1. Rakendused	8
2.3. Resonantne energia ülekanne	10
2.4. Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne	10
2.5. Luminestsentskiirguse mõõtmised	12
2.5.1. Aegviivitusega luminestsentskiirguse mõõtmine.....	12
2.6. ARC-Lum ühendid	13
3. Aparatuur ja meetodid	14
3.1. Kasutatud reagentid, aparatuur ja vahendid.....	14
3.2. ARC-ide süntees	15
3.3. ARC-Lum ühendite kontsentratsiooni määramine	16
3.4. Kasutatud ARC-Lum ühendid	16
3.5. ARC-Lum ühendid polümeerimaatriksis.....	17
3.6. ARC-Lum ühendite ergastus- ja emissioonspektri mõõtmised	18
3.7. ARC-Lum ühendite luminestsentssignaali eluea mõõtmised.....	18
3.8. ARC-Lum ühendite luminestsentssignaali kustumise sõltuvus temperatuurist	19
3.9. ARC-Lum ühendite fotostabiilsuse uurimine.....	19
3.10. Luminestsentssignaali eluigade analüüsimine	20
3.10.1. Multiekspponentsiaalne kustumine	20
3.10.2. Keskmistatud luminestsentssignaali eluiga	20
4. Tulemused ja arutelu	22

4.1.	ARC-Lum ühendite ergastus- ja emissioonispektrid	22
4.2.	Lühema ja pikema elueaga ARC-Lum ühendite luminestssignaali eluea määramine	23
4.3.	Multieksponentsiaalne kustumine	25
4.4.	Luminestssignaali eluead	27
4.5.	FRET ülekande efektiivsus.....	29
4.6.	Temperatuuri mõju ARC-Lum ühendite luminestssignaali elueale	31
4.7.	Fotostabiilsuse uurimine.....	33
5.	Kokkuvõte	35
6.	Summary	37
7.	Kasutatud kirjandus.....	39
8.	Lisad.....	41
9.	Infoleht	50
10.	Lihtlitsents.....	51
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	51
	Mina, Joana Jõgela,	51
	(autori nimi).....	51

Lühendid

Lühend	Eestikeelne vaste
5-TAMRA	5-karboksütetrametüülrodamiin
ARC	algselt adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat, hiljem üldine koodnimetus Asko Uri grupis sünteesitud ühenditele
ARC-Lum(-)	pika elueaga luminescentssignaali andev ARC, mis sisaldab vaid doonorluminofoori
ARC-Lum(Fluo)	pika elueaga luminescentssignaali andev ARC, mis sisaldab nii doonor- kui ka aktseptorluminofoori
DCE	1,2-dikloroetaan
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
Dpr	2,3-diaminopropaanhape
EM	emissiooni lainepikkus (nm)
ESI	elektropihustus-ionisatsioon (ingl <i>electrospray ionization</i>)
EX	ergastuse lainepikkus (nm)
FRET	Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne (ingl <i>Förster resonance energy transfer</i>)
HEPES	(4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape
HBTU	O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
HPLC	kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia (ingl <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	kõrge resolutsiooniga massispektromeetria (ingl <i>high-resolution mass spectrometry</i>)
LED	valgust emiteeriv diod (ingl <i>light emitting diod</i>)
LC	vedelikkromatograafia (ingl <i>liquid chromatography</i>)
LCD	vedelkristallkuvar (ingl <i>liquid crystal display</i>)
NHS	N-hüdroksüsuksiinimiid
NMM	N-metüülmorfoliin
OLED	orgaaniline valgust emiteeriv diod (ingl <i>organic light emitting diod</i>)
PIP	piperasiin
PVA	polüvinüülalkohol
RET	resonantne energia ülekanne (ingl <i>resonance energy transfer</i>)
SPPS	tahkefaasi peptiidisüntees (ingl <i>solid phase peptide synthesis</i>)
TADF	temperatuuraktiveeritud viivitusega fluorestsentskiirgus (ingl <i>thermally activated delayed fluorescence</i>)
TFA	trifluoroäädikhape
TIPS	triisopropüülsilaan

1. Sissejuhatus

Fosforestsents on luminestsentskiirgus tripletset olekust, mis kvantmehhaanilise keelatus tõttu on pika elueaga. See on suhteliselt levinud väga madalatel temperatuuridel, kuid enamasti pärsitud kõrgematel, sest temperatuuriga kaasnevad protsessid kustutavad tripletset ergastust. Toatemperatuurine fosforestsentskiirgus on viimastel aastakümnetel muutunud huvipakkuvaks valdkonnaks, kuid selle saavutamine orgaanilistes molekulides on keeruline. Toatemperatuurse fosforestsentskiirguse soodustamiseks on kasutatud nii erinevaid struktuurielemente molekulides kui ka molekulide sidumist tahkesse maatriksisse.[1] Materjale, mis emiteerivad toatemperatuurset fosforestsentskiirgust kasutatakse erinevates (gaasi, temperatuuri) sensorites [2,3,4] ning orgaanilistes valgust emiteerivates diodides ehk OLED-ites [5]. Kuna OLED-ite puhul on leitud, et võrreldes LCD LED ekraanidega on neil mitmeid eeliseid, eelkõige laiem vaatenurk, eredamad värvid ning painutatavate detailide valmistamise võimalus, on OLED-ite arengus viimase kümnendi jooksul toimunud suur hüpe. Elektrilise ergastuse tagajärjel tekib OLED-ites ergastatud singletset ja tripletset olekut suhtes 1:3, millest tulenevalt on eelistatud ained, mis lisaks fluorestsentskiirgusele on võimelised efektiivselt emiteerima ka fosforestsentskiirgust.[5]

Üheks selliseks ühendite klassiks, mis on võimelised emiteerima tripletsest olekust pikaajalist luminestsentskiirgust, on ARC-Lum(Fluo) ühendid. ARC-Lum(Fluo) ühendid koosnevad väävlit või seleeni sisaldavast aroomaatses fragmendist, millega on peptiidahela kaudu ühendatud fluorestsentsvärv. Antud ühenditel puudub lahuses vabas olekus võime pärast ergastamist emiteerida pika elueaga luminestsentssignaali [6], kuid kui doonorluminofoori tripletse oleku stabiliseerimiseks siduda ühend valguga või jääka polüvinüülalkoholi maatriksisse, tekib ka pika elueaga fotoluminestsents. Sellises olekus saab ergastuse tagajärjel toimuda ARC-Lum(Fluo) ühendites energia ülekanne väävlit või seleeni sisaldavalt doonorluminofoori tripletsest olekult aktseptorluminofoori singletsele olekule, millelt toimub fluorestsentskiirguse emissioon. Selline energia ülekanne võib olla väga efektiivne ning tekitab pika elueaga luminestsentssignaali võimendumise.[7]

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida süvendatult bakalaureusetöö „Mudelainete süntees Försteri distantse uurimiseks ARC-Lum(Fluo) sondides“ saadud tulemusi ja selle raames sünteesitud ühendite luminestsentsomadusi. Uurimustöö käigus seoti erinevaid ARC-Lum ühendeid tahkesse polümeermaatriksisse ning mõõdeti luminestsentssignaalide kustumist ajas.

Antud parameetrit kasutati energiaülekanne efektiivsuse iseloomustamiseks. Samuti iseloomustati PVA-s mitmete ARC-Lum(-) ühendite luminescentssignaali kustumise sõltuvust ajast, mida varasemalt ei ole õnnestunud teha. Luminescentssignaali eluigade detekteerimisele teostati mitmeid korduskatseid.

2.2. Toatemperatuurne fosforestsentskiirgus

Toatemperatuurne fosforestsentskiirgus on orgaaniliste ühenditega raskesti saavutatav. Enamik orgaanilisi molekule on singletses põhiolekus. Footoni absorptsiooni tulemusena toimub ergastumine mõnele singletsele energianivoole, millelt võib toimuda kiirguse eraldumine fluorestsentsina. Kuna antud protsessi käigus ei muutu elektroni spinn, on tegemist kiire protsessiga. Seevastu ergastatud tripletse oleku eluiga on küllaltki pikk ning seetõttu konkureerib tripletsest olekust kiirgamine erinevate mittekiirguslike protsessidega. Nendest protsessidest peamised on vibratsioonilised ja soojuslikud relaksatsioonid ning fosforestsentsi kustutajate, nagu molekulaarne hapnik, toime. Samas saab kõiki neid efekte oluliselt vähendada, sidudes ühendi tahkesse faasi. Tahkised on kõrgemini organiseeritud ja jäigemad võrreldes lahustega, millest tulenevalt aine liikumised on raskendatud. Samuti on tahkises hapniku ligipääs luminofoorile piiratud.[4,9]

Toatemperatuurse fosforestsentskiirguse saavutamisel on abiks kui ühend sisaldab mõnda rasket aatomit (näiteks iriidiumi, ruteeniumi, plaatina, talliumi, broomi, seleeni) soodustamaks ergastatud tripletse oleku teket ning sellest kiirgumist. Tihtipeale kasutatakse protsessi soodustamiseks ka aromaatsed karbonüülrühma sisseviimist.[10] Lisaks tuleks vähendada hapniku, kui väga efektiivse fosforestsentskiirguse kustutaja, hulka süsteemis. Selleks kasutatakse tavaliselt inertgaasi (näiteks argooni) keskkonda või reaktsiooni naatriumsulfitiga.[11] Samas on võimalik tekitada toatemperatuurset fosforestseeruvat materjali raskmetalli aatomit sisaldamata. Fosforestsentskiirguse soodustamiseks sellistes tingimustes seotakse ained erinevatesse maatriksitesse nagu polüvinüülalkohol, polümetüülmetaakrülaat, mitsellidesse või anorgaanilistesse kristallidesse.[1] Uurimused on näidanud, et sellise tehnikaga vähendatakse maatriksi jäikuse abil soojuslikke relaksatsioone ning samuti tõkestatakse hapniku kustutavat mõju luminestsentskiirgusele.[12] Kõige raskemad ja olulisemad väljakutsed saavutamaks toatemperatuurset fosforestsentskiirgust on vibratsiooniliste ülekannete piiramine ja intersüsteemse ülemineku soodustamine ergastatud tripletse olekusse ning tripletsest olekust kiirgamine.[13]

2.2.1. Rakendused

Toatemperatuurset fosforestsentskiirgust emiteerivad materjalid on viimastel kümnenditel muutunud atraktiivseks uurimisvaldkonnaks. Seda eelkõige seetõttu, et need on võimalised emiteerima tripletsest olekust pikaajalist (millisekundi ajaskaalas) luminestsentskiirgust ning on leitud, et elektrilise ergastuse tagajärjel kasutavad sellised materjalid ära kiirgumist nii

singletsest kui ka tripletsest olekust. Sellest tulenevalt kasutatakse toatemperatuurset fosforestsentskiirgust emiteerivaid materjale erinevates keemilistes ja bioloogilistes sensorites, orgaanilistes valgust emiteerivates dioodides ning isegi laserites.[2]

Toatemperatuurne fosforestsentskiirgus on väga tundlik hapniku suhtes. Seetõttu on enamik arendatavatest toatemperatuurset fosforestsentskiirgust mõõtvatest sensoritest hapniku sensorid. Kuna hapnik on väga efektiivne luminescentssignaali kustutaja, mõjutab hapniku kontsentratsioon tugevalt tripletset ergastatud olekut. Seetõttu on võimalik luminescentssignaali intensiivsuse või eluea mõõtmise järgi määrata hapniku kontsentratsiooni keskkonnas.[2,5]

Samuti on võimalik määrata osooni kontsentratsiooni õhus, kasutades selleks fosfoori sisaldavat optilist sensorit. Lee *et al.* töötasid välja uudse ning portatiivse orgaanilise toatemperatuurse fosforestsentsensori, mis on võimeline detekteerima osooni kontsentratsiooni muutust analüüsitavas õhus. Nad näitasid, et osooni kontsentratsiooni kasvamisel kahaneb fosforestsentskiirguse kvantsaagis oluliselt. Uurimuse raames saavutasid nad kõrge tundlikkuse osooni määramisel seda tüüpi sensoriga – süsteem suudab detekteerida 0,1 ppm osooni.[14]

Toatemperatuurset fosforestsentskiirgust põhinevaid sensoreid on arendatud ka näiteks temperatuuri mõõtmiseks mikrosüsteemides [3,13] ning ortofosfaatide määramiseks vees [15].

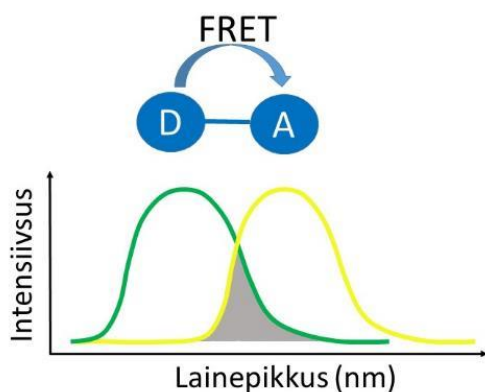
Üks atraktiivsemaid rakendusvaldkondi molekulidele, mis emiteerivad toatemperatuuril fosforestsentskiirgust, on orgaanilised valgust emiteerivad dioodid ehk OLED-id (ingl *organic light-emitting diode*). OLED-ite puhul toimub elektrilise ergastuse tulemusena valguse emissioon orgaanilistest ühenditest koosnevast kiirgavast kihist, kusjuures singletset ja tripletset ergastatud olekut tekib suhtes 1:3. Sellest järeldub, et kui OLED-ite korral rakendatakse nii fluorestsents- kui ka fosforestsentskiirgust emiteerivaid aineid, saadakse valgust oluliselt efektiivsemalt, kui ainetest, mis vaid fluorestseeruvad. OLED-id pakuvad juba praegu suurt konkurentsi turul domineerivatele LED LCD ekraanidele. OLED-ite peamiseks eeliseks on kiirem reageerimisaeg, realistlikumad värvid, tumedate piltide korral väiksem elektrikulu ning laiem vaatamisnurk. Samuti on võimalik OLED ekraane valmistada läbipaistvaid ja erinevate kujudega. OLED-eid saab kasutada ka valgustuses. On näidatud, et on võimalik saavutada anorgaaniliste LED-idega võrreldavat efektiivsust. Samas pole hetkel OLED valgustite tootmishind võrreldes anorgaaniliste LED-idega konkurentsivõimeline ning seetõttu kasutatakse OLED valgusteid eelkõige vaid peenemates disainielementides.[5]

2.3. Resonantne energia ülekanne

Resonantne energia ülekanne (RET) on mittekiirguslik energia ülekanne, kus elektroonselt ergastatud doonorluminofoorilt kandub ergastusenergia aktseptorkromofoorile. Energia ülekanne toimub dipool-dipool interaktsioonide tulemusel, mistõttu ei ole tegemist kiirgusliku energia ülekandega. RET-i korral toimub energia ülekanne 1...10 nm distantisilt. RET- põhiste meetoditega määratakse enamasti biomolekulide või nende osade omavahelist kaugust ning see võimaldab luua erinevaid katsesüsteeme.[16]

2.4. Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne

RET teoreetilised alused avaldas Theodor Förster 1948. aastal. Sellest tulenevalt nimetatakse energia ülekannet, mis sõltub tugevalt kromfooride omavahelisest distantisist (r) ning on võrdeline r^{-6} , Försteri tüüpi resonantseks energia ülekandeks ehk FRET-iks. Försteri teooria on kasutatav energiaülekanne korral nii doonori ergastunud singletsest olekust aktseptori singletsele olekule kui ka doonori ergastunud tripletsest olekust aktseptori singletsele olekule.[17] Ekslikult on FRET-i nimetatud ka fluorestsents-resonantsenergia ülekandeks, kuid resonantse energia ülekande korral fluorestsentskiirguse emissiooni ei toimu ning võimalikud on ka triplett-singlett jt üleminekud.[18] FRET-i ilmnemiseks peab olema doonorluminofoori emissiooni spektri ja aktseptorkromofoori absorptsioonspektri vahel vähemalt osaline kattumine. Mida suurem on spektraalne kattumine, seda suurem võib olla ka doonori ja aktseptori omavaheline distant, mille korral energia ülekanne saab toimuda (Joonis 2).



Joonis 2. FRET-i ülekanne. D tähistab doonorluminofoori ning A aktseptorkromofoori. Rohelise joonega on kujutatud doonorluminofoori emissioonspektrit ning kollase joonega aktseptorkromofoori absorptsioonspektrit, mille vahele jääb kattumisala, mis on tähistatud halliga.

Spektraalset kattumisintegraali kasutatakse Försteri distantsi (Försteri raadiuse) leidmisel. Viimane iseloomustab kaugust, mille korral resonantne energia ülekanne toimub 50% efektiivsusega. Teoreetiline Försteri distant avaldub:

$$R_0 = 0,02108 \left[\frac{\kappa^2 Q_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}}, \quad (\text{Valem 1})$$

kus R_0 on Försteri distantis nanomeetrites, κ aktseptori ja doonori vaheline orientatsioonifaktor, Q_D doonorluminofoori kvantsaagis aktseptori juuresolekuta, n keskkonna murdumisnäitaja (vesilahustes loetakse võrdseks 1,33-ga), $J(\lambda)$ doonori ergastusspektri ja aktseptori emissioonspektri kattumisintegraal ning 0,02108 on koefitsient, mis on rakendatav, kui neeldumiskoefitsiendi ühik on $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ja lainepikkused esitatud nanomeetrites [18]. Vastava doonor-aktseptorpaari orientatsioonifaktor oleneb doonori emissiooni ülemikudipooli ja aktseptori absorptsiooni üleminekudipooli omavahelisest asetusest. Kui dipoolid asetsevad antiparalleelselt on $\kappa^2 = 1$, paralleelselt $\kappa^2 = 4$ ning risti $\kappa^2 = 0$. Kuna enamasti doonori ja aktseptori dipoolid keskmistuvad doonori ergastusaja vältel, kasutatakse arvutustes tihtipeale $\kappa^2 = \frac{2}{3}$. [17] Doonorluminofoori ergastusspektri ja aktseptorkromofoori emissioonspektri kattumisintegraal avaldub:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}, \quad (\text{Valem 2})$$

kus $F_D(\lambda)$ on normeeritud fluorestsentskiirguse intensiivsus, $\varepsilon_A(\lambda)$ aktseptori molaarne neeldumiskoefitsient kindlal lainepikkused ning λ vastav lainepikkus.

Energia ülekande efektiivsus avaldub:

$$E = \frac{k_T}{k_T + 1/\tau_D}, \quad (\text{Valem 3})$$

kus E väljendab energiaülekande efektiivsust, k_T energia ülekande kiiruskonstanti ning τ_D ergastatud doonori eluiga aktseptori juuresolekuta. [17] Valemist 3 tuleneb, et FRET on seda efektiivsem, mida suurem on energia ülekande kiiruskonstant ning mida aeglasemad on erinevad konkureerivad relakseerumised. [8b]

Energia ülekande efektiivsuse sõltuvust kromofooride vahekaugusest on võimalik avaldada ka:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6}, \quad (\text{Valem 4})$$

kus R_0 on Försteri distantis ning r_{DA} doonori ja aktseptori vaheline distantis. Valemist 4 järeldub, et FRET-i efektiivsus on väga tugevalt sõltuvuses doonorluminofoori ja aktseptorkromofoori

omavahelisest distantist ning mida suuremaks läheb aktseptor- ja doonorkromofoori omavaheline kaugus, seda väiksemaks läheb ka energia ülekande efektiivsus.[8b]

Kasutades luminesentssignaali eluigasid on võimalik avaldada FRET-i efektiivsus:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{Valem 5})$$

kus τ_D on ergastatud doonori eluiga aktseptori juuresolekuta ning τ_{DA} ergastatud doonor-aktseptorpaari eluiga. Valemist 5 tuleneb, et mida pikem on doonor-aktseptorpaari eluiga, seda väiksem on energia ülekande efektiivsus.[17]

FRET on leidnud mitmeid kasutusalasid fotokeemias, -füüsikas, -bioloogias ning ka mujal, kuna võimaldab mõõta kahe kromofoori vahelist kaugust, kui distantid jääb 1...10 nm vahele. Seetõttu kasutataksegi FRET-i „spektroskoopilise joonlauana“.[18] Samuti soosib FRET-i kasutamist biokeemias valkude mõõtmise ja rakumembraani paksuse jäämine samasse (mõned nanomeetrid) suurusjärku.[8b]

2.5. Luminesentskiirguse mõõtmised

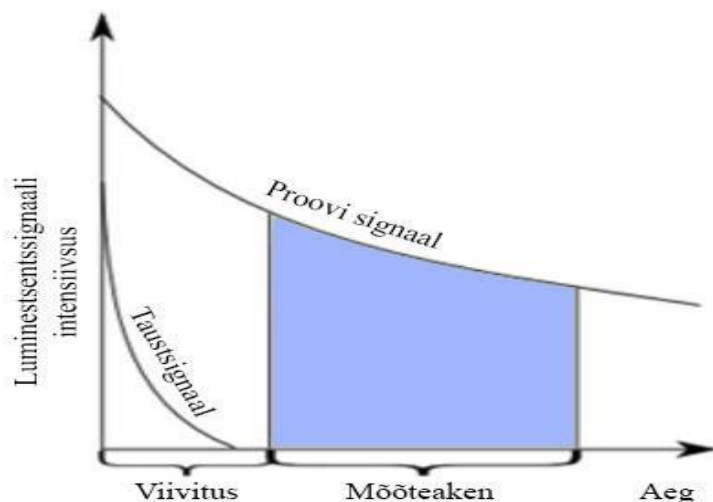
Luminesentskiirguse detekteerimisel saab eristada kahte viisi: pidev ning aegviivitusega mõõtmine. Pideva mõõtmise korral ergastatakse proovi pideva valgusallikaga ning detekteeritakse emissioonkiirguse intensiivsust. Aegviivitusega mõõtmise korral ergastatakse proovi pulseeriva valgusallikaga ning mõõdetakse kiirguse intensiivsuse kustumist ajas.[8a]

Enamik fluoretsentskiirgust detekteerivatest süsteemidest on oma lihtsuse ja odavuse tõttu pideva mõõtmise süsteemid, kuid mõõtesüsteemide arengu tõttu kogub populaarsust ka aegviivitusega mõõtmine. Kasutades aegviivitusega mõõtmist pika luminesentsi elueaga ainete korral, on meetod sageli tundlikum võrreldes pideva mõõtmisega, sest aeg-viivitusega eemaldatakse lühikese elueaga taustkiirgus.[19]

2.5.1. Aegviivitusega luminesentskiirguse mõõtmine

Pikaajaliste luminesentssignaalide detekteerimisel kasutatakse tihti aegviivitusega režiimi (Joonis 3). Aegviivitusega luminesentskiirguse mõõtmise korral kasutatakse ergastamiseks lühiajalist elektromagnetkiirguse impulssi, mis on lühemaajalisem ühendi luminesentskiirguse elueast. Proovi ergastatakse kindla lainepikkusega valgusega ning mõõtmist alustatakse teatava viivitusaja möödudes. Viivitusega luminesentssignaali mõõtmise korral saavutatakse see, et ergastusallikast tulenevat valgust ei detekteerita. Samuti

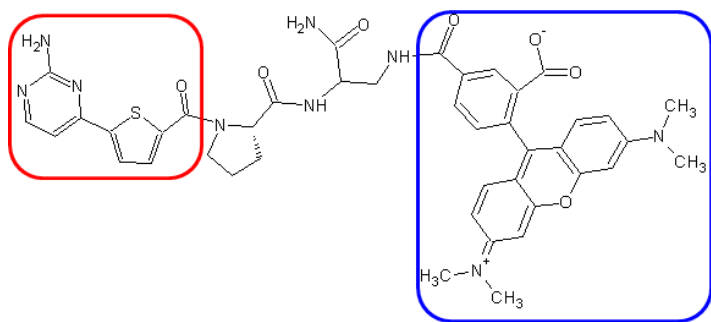
kõrvaldab selline mõõtmisviis proovide autofluorestsentsist ja valguse hajumisest tuleneva tausta, mille tõttu on see meetod hea signaal-müra suhte ja tundlikkusega.[20]



Joonis 3. Luminesentssignaali mõõtmine aegviivitusega.

2.6. ARC-Lum ühendid

Algselt defineeriti ARC-id kui adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaadid, kuid hiljem on seda lühendit kasutatud kõigi Asko Uri uurimisrühmas sünteesitud ühendite tähisena. ARC-Lum ühendid on ARC-id, mis emiteerivad pika elueaga luminesentskiirgust. Enamasti koosneb ARC-Lum ühend adensiini jälgendavast fragmendist, mis sisaldab seleeni või väävlit. Tänu sellele fragmendile omab ühend unikaalseid optilisi omadusi. Kui proteiinkinaasiga seotud ARC-Lum ühendit ergastada madalatel lainepikkustel, emiteerub pikaajalist (mikrosekundi ajaskaalas) luminesentskiirgust. Lahuses oleval vabal ühendil selliseid omadusi ei ole. ARC-Lum ühendid jagunevad kahte kategooriasse: ARC-Lum(-) ja ARC-Lum(Fluo) ühendid. ARC-Lum(-) ühendi puhul sisaldab molekul vaid fosforestseeruvat adensiini analoogi. ARC-Lum(Fluo) ühendis on molekuli lisatud ka kõrge kvantsaagisega fluorofoor (näiteks 5-TAMRA, Alexa Fluor 647) (Joonis 4).[21] Sellisel juhul toimib seleeni või väävlit sisaldav adensiini analoog doonorina ning fluorestseeruv värv aktseptorina, moodustades nii FRET-paari. Selle tulemusena tekib luminesentssignaali võimendumine, kuna doonori energia kandub efektiivselt üle aktseptorluminofoorile, mille emissioon on kõrge kvantsaagisega. Energiaülekanne eelduseks on doonorluminofoori emissioonspektri ja aktseptorluminofoori absorptsioonspektri kattumine. Väävlit või seleeni sisaldava aromaatses fragmendi fosforestsentsi emissioonspektri maksimumid jäävad 500...600 nm ümbrusesse ning sobilike fluorestsentsvärvide absorptsioonspektri maksimumid võiksid jääda vahemikku 500...700 nm. Sellistel tingimustel võiks olla FRET-i toimumine efektiivne.[7,22]



Joonis 4. ARC-Lum(Fluo) ühend ARC-2021 näitel. Punases kastis on väävlit sisaldav aroomaatne fragment, sinises kastis fluorestsentsvärv ning kastita osa tähistab linkerit. Fluorestsentsvärvi oleks tegemist ARC-Lum(-) ühendiga.

ARC-Lum ühendite eripäraks on asjaolu, et antud ühendid ei sisalda metallikomplekse, mida paljud toatemperatuuril pikaajalist luminesentskiirgust emiteerivad ühendid sisaldavad. Ühendeid kasutatakse proteiinkinaaside korral sidumis- ja väljatõrjumiskatsetes, millega saab kvantifitseerida kinaase ning iseloomustada nende inhibiitoreid. Nende ühendite eeliseks on võimalus mõõta pika elueaga luminesentskiirgust ja kasutades aeglahutusega mõõtmist, on võimalik vältida bioloogilistest süsteemidest tulenevat autofluorestsentsi. Kuna vabalt lahuses olev ühend aeglast luminesentskiirgust ei anna, on mõõdetav signaal spetsiifiline ARC-Lum ühendi ja kinaasi kompleksile, mis muudab selle kasutamise analüüsides väga mugavaks.[6]

3. Aparatuur ja meetodid

3.1. Kasutatud reagensid, aparatuur ja vahendid

Käesolevas töös iseloomustatud ARC-Lum ühendid on sünteesitud autori poolt (kui pole mainitud teisiti), kasutades tahkefaasi peptidisünteesi reagentide firmadelt: NovaBiochem ja Iris Biotech. Solvendid on soetatud firmadelt Acros Organics, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar ning Fluka. 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhape (Tio1) oli sünteesitud Kaido Vihti poolt (Tartu Ülikool) [23]. Aktseptorluminofoorina kasutatud 5-TAMRA soetati Setareh Biotechist. PVA (Mowiol® 10-98, Sigma-Aldrich) saadi kingitusena Uno Mäeorult (Tartu Ülikool). ARC-1121, ARC-1129, ARC-1180 ja ARC-669 on sünteesitud Erki Enkvisti poolt (Tartu Ülikool).

Solventide sünteesijärgseks eemaldamiseks kasutati rotaatoraurustit R-200 firmalt Büch. Mikrotiiterplaatidelt lahustijääkide aurustamine teostati vaakum-tsentrifugaalaurustiga firmalt Christ. ARC-ide kontsentratsiooni määramisel kasutati NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektromeetrit koos programmiga NanoDrop2000.

Ühendite ergastus- ja emissioonspektri mõõtmiseks kasutati mikrotiiterplaadilugejat Synergy Neo firmalt BioTek. Luminestsentssignaali eluea mõõtmisel kasutati spektrofluoromeetrit Fluoromax-4 firmalt Horiba Scientific ning fluorestsentsküveti (Perkin Elmer). Süsteemi kuulus veel termostateeritav väline küvetihoidja qpod[®] 2e (Quantum Northwest) ning optilised fiibrid mudel 1950 (Horiba Scientific) Proov kanti polüstüreenklaas alusele (Art. 3110212, Hobbyglas paksusega 2 mm). Samuti kasutati luminestsentssignaali eluea mõõtmiseks mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar firmalt BMG Labtech koos 384-süvendiliste Corning mikrotiiterplaatidega (kood 3676). Mikrotiiterplaate kasutati ka spektrite mõõtmisel Synergy Neo-ga.

Lahuste pipeteerimine teostati spetsiaalsete plastotstega automaatpipettidega firmalt Eppendorf ning lahused valmistati Eppendorf plasttubidesse, mis on peptiidide suhtes vähesiduvad. Andmete analüüsimiseks kasutati programme Prism 5.0 (GraphPad) ja Excel 2016 (Microsoft Office).

Ained puhastati kõrgefektiivse-vedelikkromatograafia (HPLC). Kasutati Scimadzu LC Solution (Prominence) HPLC süsteemi koos Gemini C18 pöördfaaskolonniga (5 µm, 250 × 4,6 mm), mis oli kaitstud Gemini C18 eelkolonniga (5 µm, 4 × 2,0 mm). Detektoriks kasutati diodrea detektorit (SPD M20A). ESI massispektrid mõõdeti Schimadzu LCMS-2020 massispektromeetriga positiivses ionisatsiooni režiimis. Eluendiks oli vesi-atsetonitriili segu (0,1 % TFA-d) gradiendina, mille voolukiirus oli 1 ml/min. Proove süstiti süsteemi käsitsi.

ARC-2007, ARC-2016 ja ARC-2017 on puhastatud Gerda Johanna Raidaru poolt, ARC-2004, ARC-2021, ARC-2022 ja ARC-2028 töö autori poolt.

3.2. ARC-ide süntees

Peptiidifragmentide sünteesil lähtuti R. B. Merrifieldi poolt 1963. aastal välja töötatud tahkefaasisünteesist [24], kasutades Fmoc- keemia edasiarendust.

Fmoc-Rink-Amid-MBHA (tootekood BR-1305) polüstüreenvaiku kaaluti 100 mg, millele järgnes vaigu pundumine DMF-is (40 minutit). N-terminaalses otsas olev Fmoc-kaitserühm eemaldati 20 % piperidiini lahusega (5 + 15 minutit), millele järgnes 5-kordne pesemine DMF-iga. N-terminaalselt kaitstud aminohape (3 ekvivalenti) ja aktivaatorite segu HOBt/HBTU (mõlemat ainet 2,85 ekvivalenti) lahustati DMF-is, lisati NMM (10 ekvivalenti) ning saadud lahus lisati reaktsioonianumasse. Toimus atsüülimisreaktsioon kestvusega 60...90 minutit. Reaktsioon viidi läbi toatemperatuuril ning sellele järgnes taas 5-kordne pesemine DMF-iga.

Iga aminohappejäägi kinnitumise kontrollimiseks sooritati Kaiseri test. Protseduure korraldati soovitud peptiidifragmendi saavutamiseni.

Produkti mahavõtmisele polüstireenvaigult eelnes pesemine 3 erineva solvendiga: 5 korda DMF-iga, 5 korda propaan-2-ooliga ning 5 korda DCE-ga ning produkt kuivatati vaakumis (1 h). Produkti eemaldamiseks vaigult kasutati TFA /TIPS/H₂O (90/5/5 ruumala põhjal) segu (3 h). Lahus koguti ümarkolbi ja lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produktile lisati vett (3 korda 1 ml) ning aurustati solvendid TFA jääkide eemaldamiseks. Sellele järgnes töötlus dietüüleetriga TIPS-i eemaldamiseks (1 kord 1 ml), mille korral dietüüleeter dekanteeriti ning sade kuivatati õhu käes. Produkt puhastati HPLC-ga.

Puhastatud produktile lisati fluorestsentsvärv, et ARC-Lum(-) ühendist sünteesida ARC-Lum(Fluo) ühend, mille luminesentsomadusi hiljem uurida. Fluorestsentsvärvi lisamiseks võeti sünteesitud aine suhtes 1,5 ekvivalenti fluorestsentsvärvi aktiivse NHS estrina ning mõlemad ained lahustati DMSO-s, mis sisaldas trietüülamiini. Reaktsioonil lasti kulgeda 4 tundi kuni üleöö. Seejärel aurustati lahusti vaakum-rotatoraurustiga, millele järgnes produkti puhastamine HPLC-ga.

3.3. ARC-Lum ühendite kontsentratsiooni määramine

Ühendite kontsentratsioon määrati tilgaspektromeetri NanoDrop 2000c-ga. Ühendi neeldumisspektri mõõtmisele eelnes spektromeetri pjedestaali puhastamine Milli-Q veega ning nullspektri mõõtmine Milli-Q vee suhtes. Seejärel mõõdeti ARC-Lum ühendi sisaldava lahuse neeldumisspekter. Ühendi kontsentratsioon lahuses arvutati vastavalt Lambert-Beer'i seadusele: $A_\lambda = \varepsilon_\lambda c l$, kus A_λ on lahuse optiline neelduvus kindlal lainepikkusel, c kontsentratsioon, ε_λ molaarne neeldumiskoeffitsient kindlal lainepikkusel ja l optiline teepikkus, mis antud masinat kasutades oli 0,1 cm. Kasutatud molaarsed neeldumiskoeffitsiendid olid määratud eelnevalt uurimisgrupis ning olid 5-TAMRA korral $\varepsilon = 78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [25] ning 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhappe $\varepsilon = 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (pH = 2) [22].

3.4. Kasutatud ARC-Lum ühendid

Antud töös kasutati 11 erinevat ARC-Lum ühendit (Tabel 1). ARC-2007, ARC-1121, ARC-1129 ning ARC-1180 puhul on tegemist ARC-Lum(-) ühenditega ning ülejäänud on ARC-Lum(Fluo) ühendid. ARC-2007, ARC-2024, ARC-2021, ARC-2022, ARC-2016 ja ARC-2017 on sünteesitud töö autori poolt bakalaureusetöö raames. ARC-2028 on sünteesitud töö autori poolt magistritöö raames. Ülejäänud ARC-Lum ühendid on sünteesitud eelnevalt

Erki Enkvisti poolt. Antud töö raames telliti autori poolt sünteesitud ARC-Lum ühenditele kõrge resolutsiooniga massispektromeetiline analüüs (ingl *High Resolution Mass Spectrometry* ehk HRMS), millest saadud täpismassid on toodud tabelis 1. Täpismassid telliti TÜ Tehnoloogiainstituudist ning mõõdeti Thermo Electron LTQ Orbitrapiga. Ühendite täisstruktuurid on toodud lisas 1.

Tabel 1. Töös kasutatud ARC-Lum ühendite koodid koos lühendite ja HRMS täpismassidega

ARC-i kood	Lühendid	HRMS (Da)*	Monoisotoopne mass (Da)
ARC-2007	Tio1	1113,6447	1113,6454
ARC-2024	Tio1-5-TAMRA	701,2405	701,2420
ARC-2021	Tio1-1pro-5-TAMRA	815,2837	815,2850
ARC-2022	Tio1-2pro-5-TAMRA	912,3369	912,3377
ARC-2016	Tio1-3pro-5-TAMRA	1009,3886	1009,3904
ARC-2017	Tio1-5pro-5-TAMRA	1203,4968	1203,4960
ARC-2028	Tio1-9pro-5-TAMRA	1591,7086	1591,7071
ARC-1121	Tio3	[22]	[22]
ARC-1129	Tio4	[22]	[22]
ARC-1180	Sele1	1077,5105	1077,5100
ARC-669	Tio1-linker-5-TAMRA	[22]	[22]

* HRMS tulbas on toodud mõõdetud massi väärtuste ümberarvutused null laenguga ühendi massile.

3.5. ARC-Lum ühendid polümeerimaatriksis

ARC-Lum ühendite luminesentssignaali eluea mõõtmiseks seoti ARC-Lum ühendid polüvinüülalkoholi (PVA-sse). Selleks valmistati 7% PVA lahus Milli-Q vees (massi järgi). 7 % lahuse jaoks kaaluti 0,53 g PVA-d, mis kanti 10 ml koonilisse kolbi. PVA-le lisati 7,00 g Milli-Q vett ning saadud segu kuumutati 80 °C juures segades üleöö.

Katseteks PHERAstar mikrotiiterplaadilugejaga pipeteeriti 20 µl homogeenset PVA lahust 0,5 ml Eppendorfi tuubi. PVA lahusele lisati 1 µl 5 µM ARC-Lum(Fluo) ühendi lahust. ARC-Lum ühendid lahustati Milli-Q vees või PVA-s. Eppendorfi tuubis tekkinud segu homogeniseeriti. Tuubist kanti 20 µl homogeenset lahust mikrotiiterplaadi mõõtesüvendisse. Seejärel paigutati mikrotiiterplaat kappi, kus lahustil lasti toatemperatuuril vähemalt 48 tundi aurustuda. Järgnevalt vakumeeriti mikrotiiterplaati umbes tund aega vaakum-rotatoraurustiga, et

eemaldada jääniiskust. Seejärel teostati mikrotiiterplaadilugejaga luminescentssignaali mõõtmised.

Katseteks Fluoromax-4 spektrofluoromeetriga valmistati 0,5 ml Eppendorfi tuubi PVA ning ARC-Lum ühendi homogeenne lahus, pidades silmas, et ARC-Lum(Fluo) ühendi korral oleks ainet 100 pmol ning ARC-Lum(-) ühendi korral 10 nmol. Tuubist kanti 20 µl homogeenset lahust polüstüreenklaasist alusele, mis aeti automaatpipeti otsikuga laiali. Polüstüreenklaasist alus koos prooviga paigutati karpi, kus lasti lahustil toatemperatuuril vähemalt 48 tundi aurustuda. Järgnevalt vakumeeriti polüstüreenklaasist aluseid umbes tund aega vaakum-rotatoraurustiga, et eemaldada jääniiskust. Seejärel teostati luminescentssignaali mõõtmised. Polüstüreenklaasist alusest olid eelnevalt valmis lõigatud vastavate mõõtmega riskülikud, mis paigutuksid 45° nurga all fluorestsentsküveti.

3.6. ARC-Lum ühendite ergastus- ja emissioonspektri mõõtmised

Spektrite mõõtmiseks kasutati mikrotiiterplaadilugejat Synergy Neo. Proovide ettevalmistus on kirjeldatud punktis 3.5. ning on sarnane proovide ettevalmistusele PHERAstar mikrotiiterplaadilugejaga. Ergastus- ning emissioonspektri mõõtmisel olid ühendite kogused 10 nmol. Ergastusspekter mõõdeti tingimuses: EX 250 ... 440 nm, samm 1 nm, EM 560 nm. Kasutati aegviivitust 100 µs ning integratsiooniaega 2000 µs. Emissioonspekter mõõdeti tingimustes: EX 337 nm, EM 400 ... 800 nm, samm 2 nm. Kasutati aegviivitust 100 µs ning integratsiooniaega 2000 µs.

3.7. ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluea mõõtmised

ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluea mõõtmise jaoks kasutati kahte erinevat aparati: mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar ning spektrofluoromeetrit Fluoromax-4.

Mikrotiiterplaadilugeja PHERAstar korral teostati mõõtmised 25 °C juures. Luminescentssignaali kustumise mõõtmisteks kasutati optilist moodulit: [ergastus (EX) 337(20), emissioon (EM) 590(50)]. Siin ja edaspidi on toodud sulgudes filtri laius (nm). Mõõtmised teostati erinevatel režiimidel: viivitusaeg 50 µs, signaali kogumine kuni 750 µs; viivitusaeg 50 µs, signaali kogumine kuni 1200 µs ja viivitusaeg 40 µs, signaali kogumine kuni 1700 µs. Mikrotiiterplaadilugejaga PHERAstar mõõdeti ARC-2024 ja ARC-2021 luminescentssignaali kustumised.

Teiste ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluigade mõõtmiseks kasutati spektrofluoromeeter Fluoromax-4, millega teostati mõõtmised toatemperatuuril.

Luminestsentssignaali kustumise mõõtmisel ARC-Lum(Fluo) ühendite korral kasutati optilisi seadeid: [(EX) 337(20), (EM) 580(20)]. Mõõtmised teostati erinevatel režiimidel: ARC-2022 korral viivitusaeg 50 μ s, signaali kogumine kuni 5000 μ s; ARC-2016 ja ARC-2017 korral viivitusaeg 100 μ s, signaali kogumine kuni 15000 μ s; ARC-2028 korral viivitusaeg 500 μ s, signaali kogumine 25000 μ s. ARC-Lum(-) ühenditel olenes optiliste seadete valik doonorluminofoori struktuurist. ARC-2007 korral kasutati optilisi seadeid: [(EX) 337(20), (EM) 575(20)], ARC-1121 korral: [(EX) 314(20), (EM) 560(20)], ARC-1129 korral: [(EX) 320(20), (EM) 560(20)] ning ARC-1180 korral: [(EX) 350(20), (EM) 590(20)]. ARC-Lum(-) ühendite korral kasutati viivitusaeg 50 μ s, kuid signaali kogumise aeg oli erinev. ARC-2007 ning ARC-1121 korral koguti signaali 200000 μ s, ARC-1129 korral 300000 μ s ning ARC-1180 korral 10000 μ s.

Kõikide mõõtmiste korral detekteeriti samades tingimustes ka puhta PVA signaal, mis lahutati vastavate mõõtepunktide signaalist. Illustreeriv pilt mikrotiiterplaadi süvenditesse ning polüstüreenklaasist alusele kantud proovist asub lisas 2.

3.8. ARC-Lum ühendite luminestsentssignaali kustumise sõltuvus temperatuurist

Spektrofluoromeetriga Fluoromax-4 teostati luminestsentssignaali eluea mõõtmised, varieerides temperatuuri 10 °C sammudega vahemikust 25 °C kuni 75 °C. Mõõtmistele eelnes proovi ettevalmistus, mida on kirjeldatud punktis 3.5. Spektrofluoromeeter Fluoromax-4 lisaseadmena kasutati termostateeritavat küvetihoidjat ning selle juhtprogrammi QBlue®. Programmist valiti soovitud temperatuur, oodati selle saavutamist ning lasti küvetiruumil ja polüstüreenklaasist alusel oleval proovil temperatuuriga kohaneda, seejärel teostati mõõtmine. Kontrollimaks, et temperatuur on antud ajaga stabiliseerunud, teostati ka kontrollmõõtmine pärast esimest mõõtmist. Temperatuuri varieeriti juhuslikus järjekorras. Mõõtmised teostati ARC-2007 ning ARC-2028-ga. Kasutatud optilised seaded on toodud punktis 3.7.

3.9. ARC-Lum ühendite fotostabiilsuse uurimine

ARC-Lum ühendite fotostabiilsuse uurimiseks kasutati mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar. Iseloomustati kahte erinevat ühendit: ARC-2016 ja ARC-669. ARC-2016 proovi ettevalmistust on iseloomustatud punktis 3.5. ARC-669 jaoks pipeteeriti mikrotiiterplaadi mõõtesüvendisse proteiinkinaas A katalüütilist alaühikut ning ARC-669. Lahused valmistati HEPES puhvris (pH=7), mis sisaldas 150 mM NaCl-i ning 0,005 % Tween-20. Mõõtmised teostati 25 °C juures statsionaarsetes tingimustes ning kasutati optilist moodulit: [EX 337(20), EM 590(50)].

3.10. Luminestsentssignaali eluigade analüüsimine

3.10.1. Multieksponentsiaalne kustumine

Luminestsentssignaali kustumist on võimalik analüüsida nii ühe- kui ka multieksponentsiaalse kustumiskõveraga. Iga aine korral selgitati välja, mitme eksponentsiaalse kustumiskõveraga oleks korrektne ühendi luminestsentssignaali eluiga iseloomustada. Selleks analüüsiti iga aine luminestsentssignaali hajuvusdiagrammi ning teostati F-test.

Hajuvusdiagrammi korral keskmistati ühe ühendi luminestsentssignaali kustumise andmed. Neid analüüsiti nii ühe-, kahe- kui ka kolmeeksponentsiaalse kustumise kõveraga. Iga sellise analüüsi tulemusena saadi mõõtepunkte iseloomustav kustumise võrrand. Kasutades saadud võrrandit, arvutati igal ajahetkel prognoositavad väärtused. Hajuvusdiagrammi koostamiseks leiti prognoositava väärtuse ja mõõdetud väärtuse erinevus. Hinnati punktide hajuvust – kui graafikul olevad punktid on ühtlaselt hajutatud, näitab see, et kasutatav regressioonvõrrand sobib. Punktide koondumise korral on tegemist aga teatavate hälvetega ning kasutatav regressioonvõrrand ei kirjelda punkte piisavalt hästi.[26]

F-testi kasutatakse dispersioonanalüüsil hajuvuse hindamiseks, mille korral jagatakse grupi keskmine erinevus vigade erinevustega ning saadakse selle tulemusena F-statistik. Nii gruppide keskmise erinevuse kui ka vigade erinevuse arvutamisel kasutatakse vabadusastmete muutust, mistõttu ka F-statistiku väärtus sõltub vabadusastmete arvust. Kui leitakse, et F-statistiku väärtus on kõrgem kui kriitiline väärtus, mis on leitav tabelitest, võib eeldada, et hüpotees pidas paika. Kui F-statistiku väärtus on madalam kriitilisest väärtusest, tuleb tõdeda, et tegemist on null-hüpoteesiga.[8c,26] Antud töö juures tähendas see kui F-testi tulemusel saadud F-statistiku väärtus oli madalam kriitilisest väärtusest, kasutati luminestsentssignaali keskmistatud eluigade arvutamisel madalama eksponendiga kustumiskõvera andmeid. Kui aga F-statistiku väärtus oli kriitilisest väärtusest kõrgem, kasutati suurema eksponendiga kustumiskõvera andmeid. Antud analüüs viidi läbi kasutades programmi Prism 5.0 (GraphPad).

3.10.2. Keskmistatud luminestsentssignaali eluiga

Arvestades, et kõikide ainete korral ei allunud nende luminestsentssignaali kustumised üheeksponentsiaalsele kustumisele, tuli kasutada keskmistatud luminestsentssignaali eluea leidmiseks matemaatilist valemit. ARC-Lum ühenditele, mille luminestsentssignaali kustumist ei iseloomustanud punktis 3.10.1. teostatud testide tulemusel üheeksponentsiaalne kustumiskõver, arvutati keskmistatud luminestsentssignaali eluiga:

$$\bar{\tau}_l = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i}, \quad (\text{Valem 6})$$

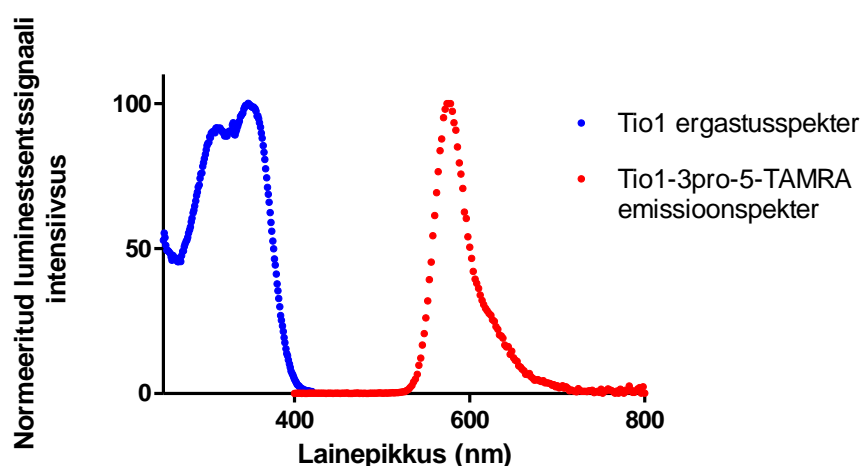
kus $\bar{\tau}_l$ tähistab keskmistatud eluiga, α_i vastavat fraktsiooni (kiire, aeglase või keskmise kiirusega komponendi osakaalu) ning τ_i selle fraktsiooni eluiga. [8c]

4. Tulemused ja arutelu

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum ühendite fosforestsentsomadusi ja triplett-singlett energia ülekannet PVA maatriksis. Kuna nii fosforestsentskiirgusel baseeruvad sensorid kui ka OLED-id on viimastel aastakümnetel teinud märgatava arengu, sooviti välja selgitada, kas ARC-Lum ühendid võiksid selles valdkonnas olla võrreldavalt efektiivsed haruldaste metallide kompleksidega. Mõõdeti nii ARC-Lum(Fluo) kui ka ARC-Lum(-) ühendite luminescentssignaali eluigasid. Antud parameeter valiti, kuna see suurus on seotud FRET-i efektiivsusega (Valem 5) ning esmases lähenduses ei sõltu luminescentssignaali eluiga aine kontsentratsioonist. Eluigasid mõõdeti kuuele ARC-Lum(Fluo) ühendile, mis erinesid üksteisest doonor- ja aktseptorkromofoori vahelise distantssi poolest. Samuti mõõdeti luminescentssignaali eluead neljale ARC-Lum(-) ühendile. Lisaks uuriti, kas ja kuidas sõltub fosforestsentsignaali eluiga temperatuurist nii ARC-Lum(Fluo) kui ka ARC-Lum(-) ühendite korral ning selgitati välja ARC-Lum(Fluo) ühendi fotostabiilsus PVA-s. Erilist tähelepanu pöörati korduskatsetele ning mõõtmiste usaldusväärsuse tõstmisele.

4.1. ARC-Lum ühendite ergastus- ja emissioonispektrid

Teadmaks, milliste optiliste seadetega mõõta luminescentssignaali eluigasid kasutatavate ARC-Lum(Fluo) sondide korral, mõõdeti sondide jaoks ergastus- ning emissioonispektrid (Joonis 5).

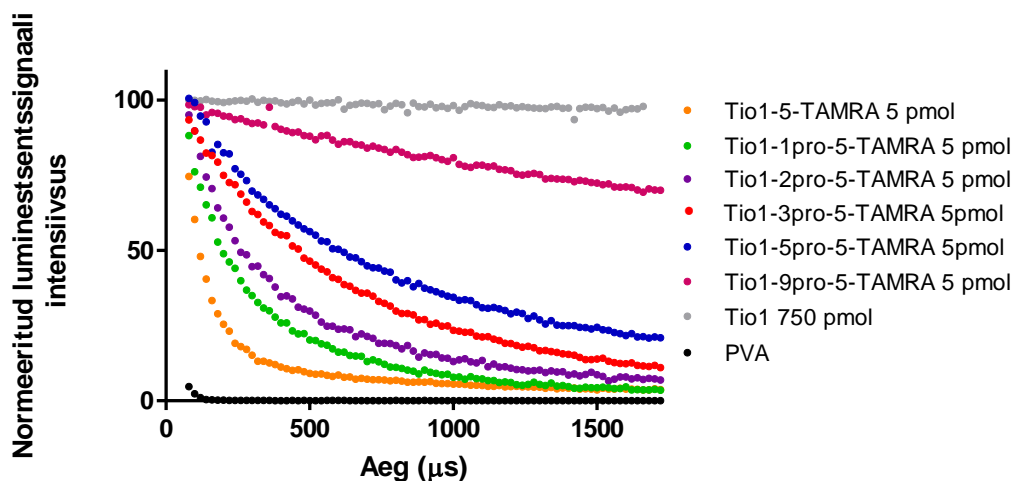


Joonis 5. Tio1 ergastusspekter ja Tio1-3pro-5-TAMRA emissioonispekter PVA-s.

Spektritest nähtub, et ergastuse maksimum jääb 340 nm ning emissiooni maksimum 580 nm juurde. Lähtuvalt nendest andmetest mõõdeti ARC-Lum(Fluo) ühendite korral luminescentssignaali eluiga ergastades ühendit 337 nm juures ning kogudes signaali 580 või 590 nm juures, olenevalt mõõtesüsteemist.

4.2. Lühema ja pikema elueaga ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluea määramine

Bakalaureusetöös „Mudelainete süntees Försteri distantssi uurimiseks ARC-Lum(Fluo) sondides“ selgitati välja, et varieerides ARC-Lum(Fluo) sondide linkeri pikkust, muutuvad ka luminescentssignaali eluead. Valemist 4 tuleneb, et mida suuremaks läheb distantss doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori vahel, seda väiksemaks läheb energiaülekanne efektiivsus ning seda pikemaks muutub luminescentssignaali eluiga. Samas tõdeti, et pikemate doonor-aktseptor kaugustega ARC-Lum(Fluo) ühendite korral ei saavutata luminescentssignaali kustumist platooni, kuna PHERAstari maksimaalne mõõtekanal on 1720 μs (Joonis 6). Sellest tulenevalt polnud võimalik hinnata ka kustumiste aeglase komponendi osakaalu ning korrektselt arvutada keskmistatud eluiga ja FRET-i efektiivsust.



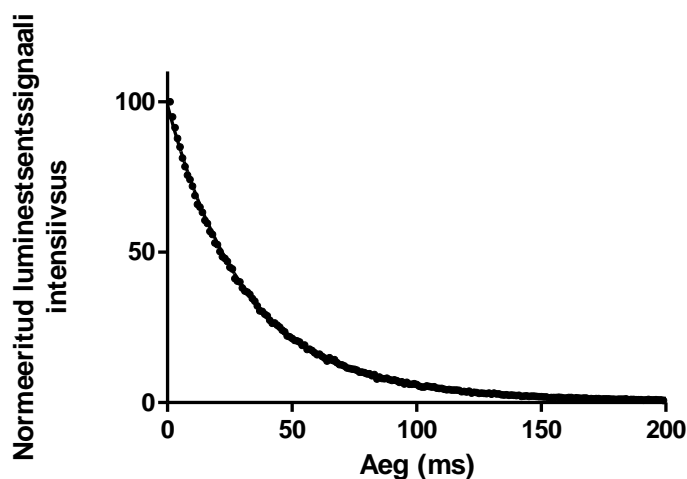
Joonis 6. ARC-Lum ühendite normeeritud luminescentssignaali kustumine ajas kasutades mõõtmiseks mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar.

Jooniselt 6 järeldub, et kasutades luminescentssignaali kustumise mõõtmiseks PHERAstari, on võimalik vaid kahel ARC-Lum(Fluo) ühendil (nulli ja ühe proliiniga ühend) saavutada kustumise käigus platoo. Samas ülejäänud ARC-Lum(Fluo) ühendite korral ei ole platoo saavutatud ning selliste kustumiskõverate analüüsimine ei ole korrektne, sest kustumise aeglase komponendi kirjeldamiseks pole piisavalt andmepunkte.

Sellest tulenevalt otsiti lahendust, kuidas mõõta pikema elueaga ARC-Lum ühendite luminescentssignaali kustumist, milleks kujunes spektrofotomeetri Fluoromax kasutusele võtmine. Fluoromaxi korral tekkis võimalus mõõta kuni 10-sekundilises mõõteaknas, mis antud ühendite puhul lahendas signaali platoole jõudmise probleemi. Fluoromaxi kasutusele võtmisega tuli aga leida uus moodus proovi ettevalmistuseks. Nimelt kasutati PHERAstariga

mõõtmiste korral mikrotiiterplaati, kuhu vastavasse süvendisse pipeteeriti vajalik kogus ARC-Lum ühendi ning 7 % PVA lahuse homogeenset segu, millel lasti 48 tundi kuivada, vakumeeriti ning teostati mõõtmine. Fluoromax on aga klassikaline spektrofluoromeeter, millega tavapäraselt teostatakse mõõtmised küveti lisatud lahuses. Prooviti leida viis, kuidas saaks ARC-Lum ühendist ja PVA-st tekkivat kilet uurida kasutades küvetihoidjat. Lahenduseks leiti kile tekitamine polüstüreenklaasist alusele. Kõigepealt sulatati polüstüreenklaasist vajalike mõõtmistega alus nii, et see mahuks diagonaalselt fluorestsentsküveti. Seejärel kanti polüstüreenklaasist alusele ARC-Lum ühendi ja PVA homogeenne lahus, lasti 48 tundi kuivada, vakumeeriti ning teostati mõõtmised Fluoromaxiga.

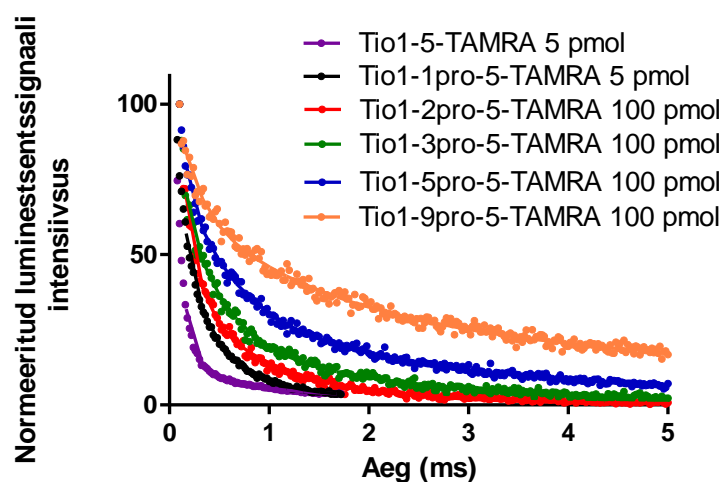
Samuti võimaldas Fluoromaxi kasutusele võtmine mõõta ARC-Lum(-) ühendeid, mille korral PHERAstariga 1720 μ s jooksul mõõtes ei toimunud märgatavat signaali kustumist (Joonis 6 hallid mõõtepunktid). Kuna magistritöö käigus sooviti välja arvutada FRET-i efektiivsused kasutatavatele ARC-Lum ühenditele (Valem 5), oli väga oluline, et ainult doonorluminofoori sisaldava ühendi luminescentssignaali eluiga oleks korrektselt mõõdetud. Fluoromaxi korral suudeti 200 ms mõõteaknas doonorluminofoori Tio1 luminescentssignaali kustumist korrektselt mõõta (Joonis 7) ning kasutades vastavat eluiga arvutada välja FRET-i efektiivsused.



Joonis 7. Vaid doonorluminofoori sisaldava ühendi (Tio1) luminescentssignaali kustumiskõver kasutades spektrofluoromeetrit Fluoromax. Ühendi hulk kiles on 10 nmol.

Võttes arvesse saadud katsetulemusi, kasutati 0 ja 1 proliiniga ARC-Lum(Fluo) ühendite korral mõõtmiseks mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar, kuna antud masin on parema tundlikkuse ning signaalistabiilsusega. Ülejäänud ARC-Lum(Fluo) ning ARC-Lum(-) ühendite korral

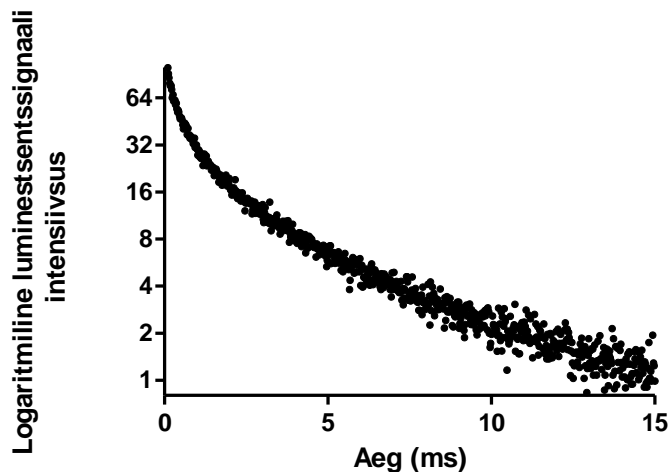
kasutati spektrofluoromeetrit Fluoromax. Vastavad luminestsentssignaali kustumiskõverad on toodud joonisel 7 ja 8.



Joonis 8. ARC-Lum(Fluo) ühendite luminestsentssignaali kustumiskõverad. Tio1-5-TAMRA ning Tio1-1pro-5-TAMRA ühendid on mõõdetud mikrotiiterplaadilugejaga PHERAstar ning ülejäänud ühendid spektrofluoromeetriga Fluoromax. Joonisel on kujutatud mõõteakent kuni 5 ms, kuigi 3, 5 ja 9 proliiniga ühendi puhul on mõõdetud signaal pikemalt. (Pikema mõõteaknaga pilt asub lisas 3.)

4.3. Multieksponentsiaalne kustumine

Analüüsides erinevate ARC-Lum(Fluo) ühendite kustumiskõveraid leiti, et alati ei kirjelda üheeksponentsiaalne kustumine vastavaid mõõtepunkte parimal viisil. Sellele viitas asjaolu, et pikemate doonor-aktseptor distantside korral esinesid suured erinevused mõõtepunktide ja mõõtepunkte kirjeldava üheeksponentsiaalse kõvera vahel. Samuti peaks üheeksponentsiaalse kustumise korral olema logaritmiline luminestsentssignaali intensiivsuse-aeg graafik sirge. Jooniselt 9 on näha, et antud graafik ei ole sirgele lähendatav.



Joonis 9. Tio1-5pro-5-TAMRA logaritmiline luminescentssignaali intensiivsus-aeg graafik. Ühendi hulk kiles on 10 nmol.

Teostati statistiline analüüs selgitamaks välja mitme eksponentsiaalse kustumise valemiga on korrektsem ARC-Lum ühendite luminescentssignaali kustumist analüüsida. Statistilisteks meetoditeks valiti punktis 3.10.1 kirjeldatud hajuvusdiagrammi ning F-statistiku analüüsimine, kuna kirjanduse andmetel on ka varasemalt selliseid meetodeid kasutatud [8c].

Tabel 2. Kriitilise väärtuse ja F-statistiku analüüs ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluea analüüsimiseks

	Tio1	Tio1-5-TAMRA	Tio1-1pro-5-TAMRA	Tio1-2pro-5-TAMRA	Tio1-3pro-5-TAMRA		Tio1-5pro-5-TAMRA		Tio1-9pro-5-TAMRA	
Null-hüpotees	1 eksp.	1 eksp.	1 eksp.	1 eksp.	1 eksp.	2 eksp.	1 eksp.	2 eksp.	1 eksp.	2 eksp.
Tõene hüpotees	2 eksp.	2 eksp.	2 eksp.	2 eksp.	2 eksp.	3 eksp.	2 eksp.	3 eksp.	2 eksp.	3 eksp.
Kriitiline väärtus	2,2	2,8	2,8	2,5	2,7	2,7	2,1	2,1	2,1	2,1
F-statistik	258,0	877,1	358,9	1851,0	3329,0	243,3	5038,0	635,3	2699,0	193,0

Hajuvusdiagrammide (Lisa 4) ning F-statistiku (Tabel 2) analüüsimise tulemusena selgitati välja, et ühe ja kahe proliiniga ARC-Lum(Fluo) ühendeid on korrektne iseloomustada kaheeksponentsiaalse kustumiskõveraga ning rohkemate proliinidega ARC-Lum(Fluo) ühendeid kolmeeksponentsiaalse kustumiskõveraga. ARC-Lum(-) ühendeid võib siiski iseloomustada ka üheeksponentsiaalse kustumiskõveraga, kuigi F-statistiku analüüsi tulemus soovitab kasutada kaheeksponendilise kustumise valemit. Nimelt sisaldab ARC-Lum(-) ühend vaid doonorluminofoori, seega peaks kustuv luminescentssignaali koosnema vaid doonorluminofoori poolt emiteeritavast valgusest. Sellest tulenevalt oleks mõistlik kasutada üheeksponentsiaalset kustumiskõverat. Lisaks olid üheeksponentsiaalse kustumiskõvera

hajumisdiagrammis hälbed väiksed ning saadud eluead langesid kokku kaheeksponendiga analüüsist saadud keskmistatud elueaga. Samas kui ARC-Lum(Fluo) ühenditel on olemas nii doonor- kui ka aktseptorluminofoor, millede omavaheline paigutus molekulide paindlikuse tõttu aines varieerub, mistõttu on kõrgemat järku kustumiskõverate kasutamine ka põhjendatud.

4.4. Luminestsentssignaali eluead

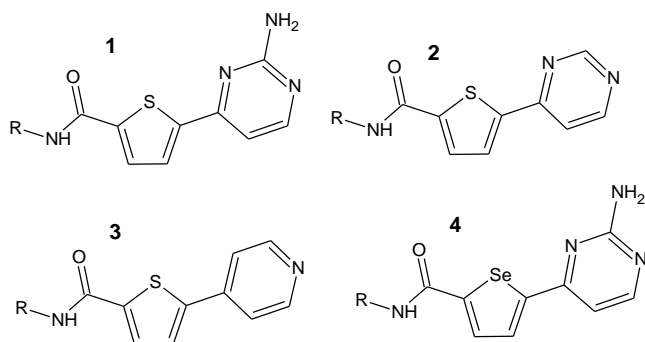
Arvestades nii alapunkti 4.2. kui ka 4.3. ning kasutades valemit 6 arvutati kõigile ainetele luminestsentssignaali eluead, mis on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Ühendite luminestsentssignaali eluead. Mõõtmise vead on antud 95 % usaldusnivoo tasemel. Paralleelkatsete arv 1, 2 ja 3 proliiniga ühenditel on 6 ning teistel 5.

	Tio1-5-TAMRA	Tio1-1pro-5-TAMRA	Tio1-2pro-5-TAMRA	Tio1-3pro-5-TAMRA	Tio1-5pro-5-TAMRA	Tio1-9pro-5-TAMRA	Tio1
Keskmine eluiga (ms)	0,0420 ± 0,0042	0,340 ± 0,066	0,620 ± 0,088	1,29 ± 0,12	2,46 ± 0,63	5,30 ± 0,96	31,70 ± 0,86

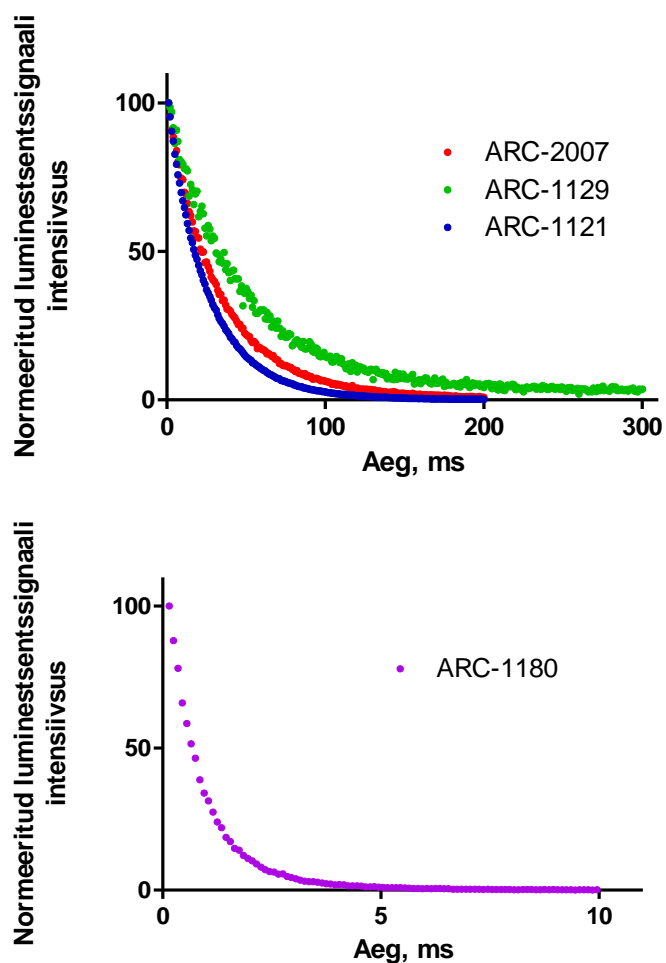
Tabelis 3 toodud tulemuste põhjal selgub, et mida pikemaks läheb doonor- ja aktseptorluminofoori omavaheline kaugus, seda pikemaks läheb ka luminestsentssignaali eluiga. See on seletatav asjaoluga, et pikemate kauguste korral väheneb FRET tüüpi ülekande efektiivsus ning sellest tulenevalt ei toimu ülekanne doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile enam niivõrd kiiresti. Samuti määrati vaid doonorluminofoori sisaldava ühendi eluiga, mida varasemalt ei ole saadud korrektselt mõõta. Kriitiliselt tuleb suhtuda 0 proliiniga ühendi eluea väärtusesse, kuna selle ühendi korral jääb keskmistatud eluiga lühemaks mõõteakna algusest. Null proliiniga ühendi korral kasutati viivitusaega 40 µs. Sellest tulenevalt ei olnud mõõtepunkte enne mõõtmisakna algust ning luminestsentssignaali kustumiskõver on saadud olulises osas ekstrapoleerides.

Kasutades spektrofluoromeetrit Fluoromax, mõõdeti luminestsentssignaali eluead ARC-Lum(-) ühenditele, mis erinesid üksteisest doonorluminofoori struktuuri poolest. Doonorluminofooride struktuurid on toodud joonisel 10.



Joonis 10. Doonorluminofooride struktuurid. Number 1 doonorluminofoor esineb Tio1-s, nr. 2 Tio4-s, nr. 3 Tio3-s ning nr. 4 Sele1-s.

Eelnevalt on väävlit sisaldavate ARC-Lum(-) ühendite luminescentssignaali eluea mõõtmised olnud komplitseeritud mikrotiiterplaadilugeja PHERAstar mõõteakna tõttu. Fluoromax võimaldas mõõta pikemates mõõteakendes, mille korral jõudis luminescentssignaali platooni (Joonis 11).



Joonis 11. ARC-Lum(-) ühendite luminescentssignaali kustumised. Ühendite hulk kiles on 10 nmol.

Andmeid analüüsiti üheeksponentsiaalse kustumiskõveraga ning kõigile ainetele leiti luminescentssignaali eluiga, mis on toodud tabelis 4. Tulemused, et seeleni sisaldava ühendi luminescentssignaali eluiga on lühem võrreldes väävlit sisaldavate ühendite luminescentssignaali eluiga, olid ootuspärased. Kuna seleen on raskem aatom võrreldes väävliga, siis on fosforestsentskiirgus soodustatud (fosforestsentskiirguse kiiruskonstant suureneb aatommassi suurenemisega) ning toimub kiiremini kui väävlit sisaldavate ühendite korral.[27]

Tabel 4. Doonorluminofoori sisaldavate ARC-Lum ühendite luminescentssignaali eluead. Mõõtmiste vead on antud 95 % usaldusnivoo tasemel. Paralleelkatsete arv Tio1 korral on 5 ning ülejäänud ühendite puhul 3.

	Tio1	Tio4	Tio3	Sele1
Keskmistatud eluiga (ms)	31,70 ± 0,86	43,03 ± 0,62	24,93 ± 0,57	0,79 ± 0,12

4.5. FRET ülekande efektiivsus

Ühendite luminescentssignaali eluigadest arvutati FRET ülekande efektiivsused iga ARC-Lum(Fluo) ühendi jaoks, kasutades valemit 5. Selleks jagati ARC-Lum(Fluo) ühendi ehk doonor- ja aktseptorluminofoori sisaldava ühendi luminescentssignaali eluiga ARC-Lum(-) ühendi ehk ainult doonorluminofoori (Tio1) sisaldava ühendi luminescentssignaali elueaga. Leitud jagatis lahutati ühest, mille tulemusena saadigi FRET-tüüpi energia ülekande efektiivsuste jaotus. Tulemused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. FRET efektiivsused

	Tio1-5-TAMRA	Tio1-1pro-5-TAMRA	Tio1-2pro-5-TAMRA	Tio1-3pro-5-TAMRA	Tio1-5pro-5-TAMRA	Tio1-9pro-5-TAMRA
FRET-i efektiivsus*	>0,998	0,990 (0,991...0,988)	0,980 (0,982...0,978)	0,960 (0,964...0,956)	0,924 (0,936...0,909)	0,835 (0,865...0,819)

* FRET-i efektiivsustes on toodud välja keskministatud väärtused. Sulgudes on iga ühendi jaoks FRET-i efektiivsuse vahemik.

Tabelis 5 esitatud tulemustest selgub, et energia ülekande efektiivsus lühematel doonor- ja aktseptorluminofoori distantidel on peaaegu 100 %. Samas on ka 9 proliiniga ühendi korral keskmiseks energia ülekande efektiivsuseks ~84 %. Seega toimub väga ulatuslik energia ülekanne ning aktseptorluminofoori tripletsest olekust aktseptorile ja sealt kiirguse emissioon.

Kirjanduses on välja toodud, et ühe proliinijäägi pikkuseks proliini heeliksis on 0,3 nm [28]. Samuti on kindlaks tehtud, et proliiniheeliks kujutab endast jäigemapoolset struktuuri, mida kasutatakse molekulaarse joonlauana. Samas pikemate ahelate korral (kui proliine on juba üle

12), muutub aina suuremaks tõenäosus, et heeliksis on üks proliinijääk *cis*- konformatsioonis, millest tulenevalt toimub ahela kõverdumine.[29,30] Teades, et ühe proliinijäägi pikkus heeliksis on 0,3 nm konstrueeriti proliinijäägi arv-FRET ülekande kiiruskonstant graafik vastavalt valemile:

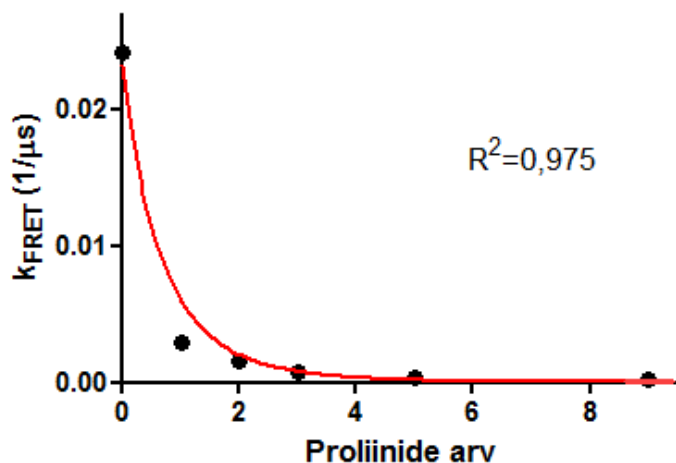
$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0^6}{r_{DA}^6} \right), \quad (\text{Valem 7})$$

kus k_T tähistab FRET ülekande kiiruskonstanti, τ_D doonorluminofoori eluiga, R_0 Försteri teoreetilist distantssi ning r_{DA} doonor- ja aktseptorluminofoori üleminekudipoolide vahelist distantssi.[17]

Selleks, et rakendada valemit 7, tuli esmalt välja arvutada ARC-Lum(Fluo) ühendite luminescentssignaali kustumises FRET-i iseloomustav kiiruskonstant, kustumine tervikuna koosneb peamiselt kahest tegurist: doonorluminofoori fosforestsentssignaali kustumise komponendist ning FRET-i komponendist doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile, mis on avaldatav:

$$k_T = k_{DA} - k_D, \quad (\text{Valem 8})$$

kus k_T on FRET ülekande kiiruskonstanti ning k_{DA} ja k_D vastavalt ARC-Lum(Fluo) ning ARC-Lum(-) luminescentssignaali kiiruskonstant.[8b] Ühendite luminescentssignaali kiiruskonstandid leiti keskmistatud luminescentssignaali eluigade pöördväärtusena. Samuti tuli leida doonor- ja aktseptorkromofoori üleminekudipoolide vaheline kaugus. See koosnes samuti kahest komponendist: oligoprolinide pikkusest ning mittevarieeritavate fragmentide pikkusest peptiidis. Oligoprolinide pikkuse leidmiseks tuli nende arv korrutada kirjanduses toodud 0,3 nm. Muudest struktuurielementidest tuleneva distantssi hinnang leiti ülejäänud sidemete arvust ja pikkustest. Antud andmete põhjal koostati proliinijäägi arv-FRET ülekande kiiruskonstant seos (Joonis 12). Teostades analüüsi, hinnati eksperimentaalseks Försteri distantiks ~3,6 nm. Bakalaureusetöö raames saadi selleks suuruseks ~2,7 nm, kuid sel ajal mõõtmisi tehes polnud veel 9 proliiniga ühendit sünteesitud. Samuti polnud kõigi ühendite korral mõõdetud kustumiskõveraid piisavalt pika aja jooksul ning doonorkromofoori fosforestsentssignaali eluea hinnang oli eriti ebatäpne. Bakalaureusetöö raames kasutati ARC-Lum(-) ühendi hinnatavat eluiga 13 ms (Joonis 6, hallid mõõtepunktid), kuid magistriritöö raames mõõdeti, et see on umbes 3 korda suurem [(31,70 ± 0,86) ms] (Joonis 7).



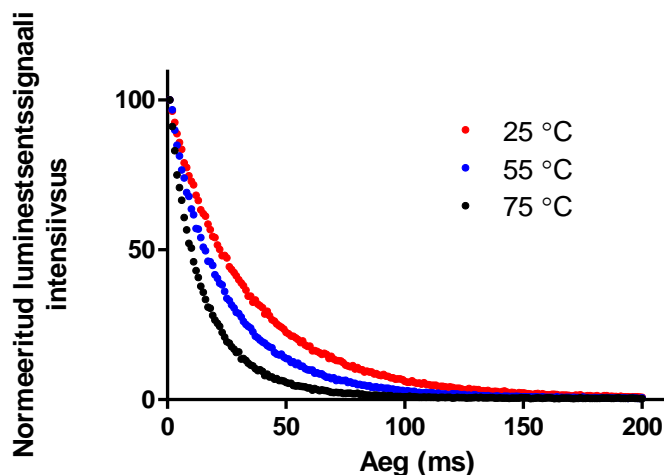
Joonis 12. FRET ülekande kiiruskonstandi sõltuvus proliinide arvust.

Kasutades valemit 1 ja 2 on võimalik välja arvutada teoreetiline Försteri distant. Selleks leiti doonorluminofoori emissioonspektri ja aktseptorluminofoori absorptsioonspektri kattumisintegraal vastavalt valemile 2. Aktseptorluminofoori molaarse neeldumiskoeffitsiendina kasutati varasemalt uurimisgrupi poolt leitud väärtust, milleks oli $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [25]. Kirjandusest leiti keskkonna ehk PVA murdumisnäitajaks 1,500 [31]. Doonorluminofoori kvantsaagiseks hinnati 3% [avaldamata andmed, mõõdetud Lars-Olof Pålssoni poolt (Durham University)]. Eelnevalt leitud kattumisintegraali ning murdumisnäitajat kasutati R_0 väärtuse arvutamiseks ning selleks saadi $\sim 3,1 \text{ nm}$. Teoreetiline R_0 väärtus erineb eksperimendi andmetest hinnatud R_0 väärtusest umbes $0,5 \text{ nm}$ võrra. Antud töös tuleb arvestada, et kasutades valemit 2, ei ole kindlalt teada κ^2 , kuna tegemist ei ole vesilahusega. Eeldatakse, et vesilahuste korral toimub dipoolide orientatsioonide keskmistumine ning seetõttu võib kasutada väärtust $\frac{2}{3}$. Kui aga luminofoorid on seotud jäika maatriksisse, võib selle keskmine väärtus olla erinev $\frac{2}{3}$. Samas kasutades R_0 väärtuse arvutamiseks valemit 7, ei ole kindlalt teada üleminekudipoolide vaheline kaugus, vaid antud suurus on hinnanguline. Seda kõike arvesse võttes on $0,5 \text{ nm}$ erinevus teoreetilise ja arvutatud R_0 vahel väike.

4.6. Temperatuuri mõju ARC-Lum ühendite luminescentssignaali elueale

Kasutades spektrofluoromeetrit Fluoromax, mõõdeti luminescentssignaali eluead erinevatel temperatuuridel ühe ARC-Lum(Fluo) ühendi ning ühe ARC-Lum(-) ühendi näitel.

ARC-Lum(-) ühendina kasutati Tio1-te. Tulemused on toodud joonisel 13 ja luminescentssignaali eluigade väärtused tabelis 6.



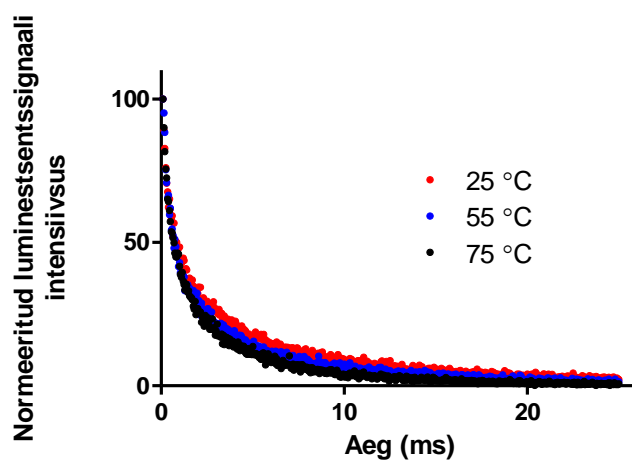
Joonis 13. Tio1 luminescentssignaali kustumise sõltuvus temperatuurist. Ühendi hulk kiles on 10 nmol.

Tabel 6. Tio1 luminescentssignaali eluigade muutus varieerides temperatuuri. Mõõtmiste vead on antud 95 % usaldusnivoo tasemel. Paralleelkatsete arv iga temperatuuripunkti korral on 3.

Temp (°C)	25	35	45	55	65	75
Eluiga (ms)	32,30 ± 1,47	30,60 ± 0,65	27,80 ± 0,85	25,30 ± 0,48	19,50 ± 0,67	14,80 ± 0,71

Tabelis 6 esitatud tulemustest on näha, et mida kõrgemaks läheb mõõtmise käigus kasutatav temperatuur, seda lühemaks muutub detekteeritav eluiga. Antud tendents on ootuspärane, kuna temperatuuri kasvades on soodustatud ergastatud tripletsest olekust mittekiirguslike protsesside toimumine ning seetõttu väheneb luminescentssignaali eluiga [8a].

Temperatuuri varieeruvuse katse viidi läbi ka ARC-Lum(Fluo) ühendiga, milleks kasutati Tio1-9pro-5-TAMRA-t. Tulemused on toodud joonisel 14.

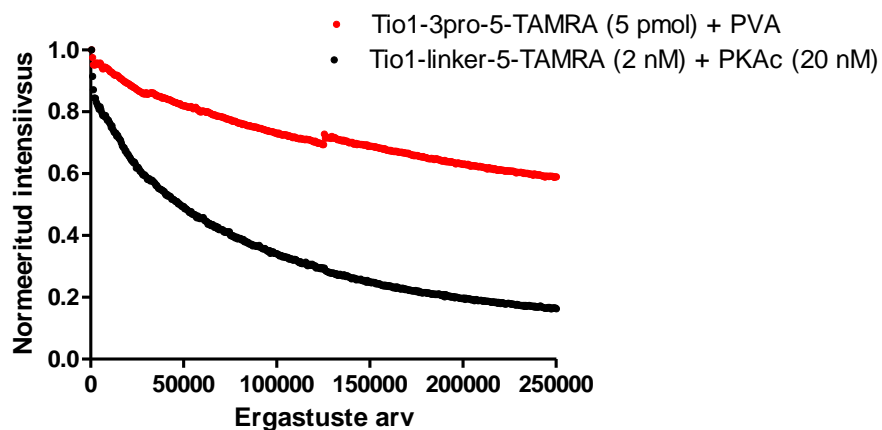


Joonis 14. Tio1-9pro-5-TAMRA luminescentssignaali eluea sõltuvus temperatuurist. Ühendi hulk kiles on 100 pmol.

Võrreldes 25 °C ja 75 °C juures ARC-Lum(-) ühendi luminescentssignaali eluiga, on näha enam kui kahekordset eluea vähenemist. Luminescentssignaali eluiga 25 °C on $(32,30 \pm 1,47)$ ms ja 75 °C korral $(14,80 \pm 0,71)$ ms. Samas ARC-Lum(Fluo) ühendi (Joonis 14) puhul niivõrd suurt luminescentssignaali eluea muutust temperatuuri varieerides ei täheldatud. ARC-Lum(Fluo) ühendi korral oli luminescentssignaali keskmistatud eluiga 25 °C juures 5,3 ms ning 75 °C korral 3,7 ms. Antud fenomeni võib seletada sellega, et 9 proliiniga ühendi korral on ARC-Lum(Fluo) ühendi FRET-i efektiivsus umbes 84 %, millest tulenevalt toimub efektiivne energia ülekanne doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile. Temperatuuri tõustes suureneb küll mittekiirguslike tripletsest olekut kustutavate protsesside kiirus, mida näeme doonorluminofoori poolt emiteeritava kiirguse eluea kahanemises, kuid energia ülekanne aktseptorluminofoorile on siiski oluliselt efektiivsem ning luminescentssignaali eluea vähenemine on väike. Sellest järeldub, et ARC-Lum(Fluo) ühendeid saaks tõenäoliselt kasutada OLED lampides. Tihti peale sõltub OLED valgustite efektiivsus temperatuurist (temperatuuri kasvades efektiivsus kahaneb) [32], kuid eelnevast katsest järeldub, et töötades temperatuurivahemikus 25 °C kuni 75 °C ei vähene ARC-Lum(Fluo) ühendite luminescentsomadused märgatavalt. ARC-Lum(-) ühendeid saaks seevastu kasutada fosforescentskiirgusel baseeruvates temperatuurisensorites. Samas tuleks selleks enne leida maatriks, mille omadused mõõdetavas temperatuurivahemikus muutuvad rohkem kui PVA-l. Kuna polümeerid hakkavad erinevatel temperatuuridel pehmenema, peaks selline optimeerimine olema võimalik. Luminescentssignaali eluea sõltuvus temperatuurist mõõdeti ka lühema doonor-aktseptorluminofoori vahekaugusega ARC-Lum(Fluo) ühenditele, kuid kuna nende ühendite korral oli energiaülekande efektiivsus oluliselt üle 90 %, ei erinenud luminescentssignaali eluead temperatuuri varieerides märgatavalt.

4.7. Fotostabiilsuse uurimine

Uurimaks kas ja kuivõrd mõjutab luminofooride stabiilsust ühendi sidumine polümeermaatriksiga, võrreldi polümeeriga seotud ARC-Lum(Fluo) ühendi ning proteiinkinaas A katalüütilise alaühikuga kompleksis oleva ARC-Lum(Fluo) sondi luminescentssignaali intensiivsuse sõltuvust ergastuste arvust (Joonis 15).



Joonis 15. Fosforescentssignaali intensiivsuse sõltuvus ergastuste arvust.

Ergastuste arvu suurenedes on mõõtmistulemustest näha luminescentssignaali intensiivsuste erinevust PVA-ga seotud ning lahuses oleva ARC-Lum(Fluo) ühendi korral. Ergastuste arvu suurenedes väheneb mõlema ühendi luminescentssignaali intensiivsus, kuid lahuses oleva ARC-Lum(Fluo) ühendi luminescentssignaali intensiivsuse vähenemine on märgatavam võrreldes PVA-ga seotud ühendiga. Seega stabiliseerib polümeermaatriks ühendit fotopleekumise eest paremini kui lahus, kuna hapniku juurepääs ergastatud tripletsele olekule on raskendatud. Polümeermaatriksis saab tripletes ergastatud oleku stabiilsust veelgi tõsta, kui täielikult eemaldada süsteemist hapnik ning niiskus. Seda võiks teha näiteks argooni keskkonnas pipeteerides. Lisaks saab fotostabiilsust tõsta varieerides polümeermaatriksit.

5. Kokkuvõte

Magistritöö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum ühendite luminesentsomadusi polüvinüülalkoholis, jätkuna bakalaureusetööle „Mudelainete süntees Försteri distantssi uurimiseks ARC-Lum(Fluo) sondides“. OLED-ite ning fosforescentskiirgusel põhinevate sensorite areng on viimastel aastakümnetel olnud märgatav, seetõttu sooviti uurida, kas ARC-Lum ühendid sobiksid sellisteks rakendusteks. Selleks sünteesiti erineva doonor- ja aktseptorluminofoori vahelise distantliga ARC-Lum(Fluo) ühendite seeria ja uuriti nende luminesentssignaalide eluigasid PVA-s. Samuti võeti kasutusele uus mõõtesüsteem ning sellega kaasnevalt muudeti proovi ettevalmistuse meetodit. Lisaks teostati hulgaliselt paralleel- ja kordusmõõtmisi andmete korratavuse kontrollimiseks ja usaldusväärsuse tõstmiseks. Mõõdeti fosforesentsi eluead ka neljale ARC-Lum(-) ühendile, mida varem polnud õnnestunud teha. Viimasena uuriti ARC-Lum(Fluo) kui ka ARC-Lum(-) ühendite luminesentskiirguse temperatuuri sõltuvust ja fotostabiilsust.

Teoreetilises osas kirjeldati luminesentskiirgust ning selle erinevaid liike, kusjuures erilist tähelepanu pöörati toatemperatuursele fosforesentsile ning selle rakendusalaadele. Tehti ülevaade ARC-Lum(Fluo) ja ARC-Lum(-) ühenditest. Selgitati Försteri tüüpi resonantse energia ülekande olemust ning selle toimumist ARC-Lum(Fluo) ühendites.

Töö eksperimentaalses osas kirjeldati erinevaid meetodeid ARC-Lum sondide luminesentseluea mõõtmiseks. Mõõtmisteks võeti kasutusele kile tekitamine sobivate mõõtmetega polüstüreenklaasist alusele, mis asetati diagonaalselt küvetti ja sooritati luminesentseluea mõõtmisi. Spektrofluoromeetri kasutuselevõtmisega oli võimalik mõõta senisest pikemaid luminesentsi eluigasid, mis võimaldas uurida ka ARC-Lum(-) ühendite fosforesentsi kustumist PVA-s, mida varasemalt ei ole saanud korrektselt teha. Sünteesiti uus (9 proliiniga) ARC-Lum(Fluo) ühend eesmärgiga laiendada ainete seeriat suurema doonor- ja aktseptorluminofoori omavahelise kauguse suunas. Kuna pikemas perspektiivis plaanitakse kasutada ARC-Lum(Fluo) ühendeid OLED-ites ja sensorites, sooviti sellise tegevusega kaardistada luminesentssignaali eluea sõltuvust doonor-aktseptorluminofoori vahelisest kaugusest. Töö raames määrati keskmistatud luminesentssignaali eluead viiele ARC-Lum(Fluo) ühendile. Kõige lühema doonor-aktseptorluminofoori vahelise kaugusega ühendi luminesentssignaali eluiga oli $(0,0420 \pm 0,0042)$ ms ning kõige pikema kaugusega ühendi oma $(5,30 \pm 0,96)$ ms. ARC-Lum(-) ühendite, mille adenosiini analoogis sisaldus kas väävel või seleen, fosforesentsi eluead küündisid kuni 43 ms. Ootuspäraselt oli seleeni sisaldava ühendi luminesentssignaali eluiga lühem kui väävlit sisaldavate ühendite oma. Saadud

andmetest arvutati välja FRET-i efektiivsused ARC-Lum(Fluo) ühenditele, mis ka 9 proliiniga ühendi korral jäi keskmiselt umbes 84 % juurde ning lühemate ühenduste korral olid suuremad kui 99 %. FRET-i kiiruskonstantide ning doonor- ja aktseptorluminofooride omavahelise kauguse varieerumisest saadi hinnanguline eksperimentaalne Försteri distant, milleks tuli ~3,6 nm. Kasutades doonorluminofoori kiirgusspektrit ja aktseptorluminofoori absorptsioonspektrit ning doonorluminofoori kvantsaagist arvutati välja ka teoreetiline Försteri distant, milleks saadi ~3,1 nm. Lisaks näidati temperatuuri varieerimise mõju ARC-Lum ühendite luminesentssignaali eluigadele. Varieerides mõõtmistemperatuuri 25 °C kuni 75 °C, leiti, et ARC-Lum(-) ühendi korral väheneb luminesentssignaali eluiga veidi enam kui 2 korda [(32,30 ± 1,47) ms 25 °C juures ja 75 °C korral (14,80 ± 0,71) ms]. Samas leiti, et ARC-Lum(Fluo) ühendi korral niivõrd suurt luminesentssignaali eluigade erinevust nendel temperatuuridel ei täheldatud (5,3 ms 25 °C juures, 3,7 ms 75 °C juures). Antud fenomeni seletati efektiivse FRET-i ülekandega (antud ühendis umbes 84 %) doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile. Fosforesentskiirguse sõltuvust temperatuurist saaks ära kasutada temperatuurisensorites ning luminesentskiirguse mittesõltumine temperatuurist oleks soodne omadus OLED valgustites.

Magistritöö sisaldas endas mitmeid eelkaitseid, mis andsid palju uutset informatsiooni ARC-Lum ühendite luminesentsomaduste kohta. Tulemused annavad kindlust, et ARC-Lum ja ARC-Lum(Fluo) ühendid võiksid leida rakendust nii temperatuuri- kui ka hapniku sensorites ning samuti OLED valgustites. Samuti leiti, et vastavalt soovitud rakendusala iseärasustele on lihtne muuta emiteerivata luminesentskiirguse eluiga, kuna see on seoses doonor- ja aktseptorluminofoori vahelise kaugusega.

6. Summary

The aim of the master's thesis was the examination of luminescence properties of ARC-Lum probes in polyvinyl alcohol (PVA) synthetic polymer to continue the research that was described in author's bachelor's thesis „Synthesis of model compounds for the study of Förster's radius in ARC-Lum(Fluo) probes". The development of OLEDs and phosphorescence emission-based sensors have attracted considerable attention in recent years and therefore ARC-Lum compounds were studied to be used for these applications. ARC-Lum(Fluo) compounds possessing different distances between the donor and acceptor chromophores were synthesized and their luminescence lifetime was measured. A new measurement method and instrumental setup were introduced, which also required the introduction of a new sample preparation technology. Many parallel measurements were carried out to rise the credibility of the data. Phosphorescence lifetimes of four ARC-Lum(-) compounds were measured in PVA, which was not possible with the previous measuring method. Also the temperature dependence of the luminescence emission properties of ARC-Lum(Fluo) and ARC-Lum(-) probes were examined.

In the theoretical part of this study different types of luminescence emission were described. More attention was paid to room temperature phosphorescence and its applications. In addition to that, an overview of ARC-Lum(Fluo) and ARC-Lum(-) probes was given. The mechanism of the FRET and the relation of FRET to ARC-Lum(Fluo) probes was described.

In the experimental part of this research different methods for measuring luminescence lifetime of ARC-Lum probes were described. A new method which involved the generation of a film on a polystyrene plastic plate and placing it diagonally in to the cuvette was taken into use. The application of a spectrofluorometer made possible the measurement of the luminescence lifetimes of ARC-Lum(Fluo) and ARC-Lum(-) probes that possessed very long luminescence decay times that were out of the range of previously used equipment. Also, a new ARC-Lum(Fluo) compound comprising 9 proline residues in the linker chain, was synthesized to increase the distance between the donor and the acceptor chromophores. Since in the longer perspective ARC-Lum(Fluo) compounds could be used in OLEDs or sensors, the goal of this study was the establishment of the dependency of the luminescence signal dependence on the distance between the donor and the acceptor chromophores.

In this study, averaged luminescence signal lifetimes for five ARC-Lum(Fluo) compounds were determined. The compound with the shortest distance between the donor and the acceptor chromophores possessed luminescence signal lifetime of (0.0420 ± 0.0042) ms and the compound with the longest distance between the donor and the acceptor chromophores had luminescence signal lifetime of (5.30 ± 0.96) ms. Phosphorescence lifetimes of ARC-Lum(-) compounds, comprising sulfur or selenium atom in the adenosine analogue moiety, were measured to be upto 43 ms. As expected, compounds comprising selenium atom had shorter luminescence signal lifetime than compounds containing sulfur atom. For ARC-Lum(Fluo) probe with 9 prolines, the measured FRET efficiency was 84 % and the energy transfer efficiency reached over 99 % for compounds with shorter linkers. Varying FRET rate constants and the distance between the acceptor and donor chromophores, estimated experimental Förster's distance was calculated as ~ 3.6 nm. Using the emission spectrum of the donor chromophore, the absorption spectrum of the acceptor chromophore, and the quantum yield of the donor chromophore, the theoretical Förster's distance was calculated to be of 3.1 nm. In addition to that, the effect of temperature on the luminescence signal lifetime was determined. Varying the temperature from 25 °C to 75 °C with 10 °C steps, it was established that the luminescence lifetime of ARC-Lum(-) probe was reduced about 2-fold (32.3 ms at 25 °C, 14.8 ms at 75 °C). In case of ARC-Lum(Fluo) probe, the measured difference between luminescence lifetime at different temperatures was not so significant (5.3 ms at 25 °C, 3.7 ms at 75 °C). This phenomenon was explained by the efficient FRET (average of 84 %) from the donor to the acceptor chromophore. It was pointed out that the substantial temperature dependency of phosphorescence radiation of the compounds could be useful for construction of temperature sensors. On the other hand, the temperature independent luminescence could be useful property of the compound for development of OLED light sources.

This thesis discloses results of many experiments which gave a lot of new information about the photoluminescence properties of ARC-Lum compounds in PVA. The results give some certainty that ARC-Lum compounds are usable in temperature and oxygen sensors or OLED light sources. Also, the knowledge that the alteration of distance between the donor and the acceptor luminophores affects the luminescence lifetime could be useful for construction of different luminescence-based devices.

7. Kasutatud kirjandus

1. Yong, G., She, W., Zhang, Y., Room-temperature phosphorescence in solution and in solid state from purely organic dye, *Dyes Pigm.*, **2012**, 95, 161–167
2. Banerjee, S., Kuznetsova, R. T., Papkovsky, D. B., Solid-state oxygen sensors based on phosphorescent diiodo-borondipyrromethene dye, *Sensors and Actuators B*, **2015**, 212, 229–234
3. Wang, X., Wolfbeisa, O. S., Meier, R. J., Luminescent probes and sensors for temperature, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 7834–7869
4. Sánchez-Barragán, I., Costa-Fernández, J.M., Sanz-Medel, A., Valledor, M., Campo, J.C., Room-temperature phosphorescence (RTP) for optical sensing, *Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, 958–967
5. Uoyama¹, H., Goushi, K., Shizu, K., Nomura, K., Adachi, C., Highly efficient organic light-emitting diodes from delayed fluorescence, *Nature*, **2012**, 492, 234–238
6. Ekambaram, R., Enkvist, E., Manoharan, Gb., Ugandi, M., Kasari, M., Viht, K., Knapp, S., Issinger, O.-G., Uri, A., Benzosenadiazole-based responsive long-lifetime photoluminescent probes for protein kinases, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 4096–4098
7. Kasari, M., Ligi, K., Williams, J.A., Vaasa, A., Enkvist, E., Viht, K., Pålsson, L.O., Uri, A., Responsive microsecond-lifetime photoluminescent probes for analysis of protein kinases and their inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1834, 1330–1335
8. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, USA, **2006**
 - a) 1–25
 - b) 443–468
 - c) 133–144
9. Yang, Z., Mao, Z., Xie, Z., Zhang, Y., Liu, S., Zhao, J., Xu, J., Chi, Z., Aldredb, M. P., Recent advances in organic thermally activated delayed fluorescence materials, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 915–1016
10. B. Ventura, A. Bertocco, D. Braga, L. Catalano, S. d'Agostino, F. Grepioni, P. Taddei, Luminescence Properties of 1,8-Naphthalimide Derivatives in Solution, in Their Crystals, and in Co-crystals: Toward Room-Temperature Phosphorescence from Organic Materials, *J. Phys. Chem.*, **2014**, 118, 18646–18658
11. Mukherjee, S., Thilagar, P., Recent advances in purely organic phosphorescent materials, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 10988–11003
12. Kwon, M.S., Yu, Y., Coburn, C., Phillips, A.W., Chung, K., Shanker, A., Jung, J., Kim, G., Pipe, K., Forrest, S.R., Youk, J. H., Gierschner, J., Kim, J., Suppressing molecular motions for enhanced room-temperature phosphorescence of metal-free organic materials, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 8949–8955
13. Dongwook, L., Bolton, O., Kim B. C., Youk, J. H., Takayama, S., Kim, J., Room Temperature Phosphorescence of Metal-Free Organic Materials in Amorphous Polymer Matrices, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 6325–6329
14. Lee, D., Jung, J., Bilby, D., Kwon, M. S., Yun, J., Kim, J., A Novel Optical Ozone Sensor Based on Purely Organic Phosphor, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7, 2993–2997

15. Traviesa-Alvarez, J. M., Costa-Fernández, J. M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., Flow-through solid-phase energy transfer-room temperature phosphorescence for orthophosphate determinations at trace levels, *Talanta.*, **2004**, 62, 827–833
16. Scholes, G. D., Long-range resonance energy transfer in molecular systems., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2003**, 54, 57-87
17. Medintz, I., Hildebrandt, N., FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications, Wiley-VCH, Germany, **2014**, 23–59, 105–156
18. Braslavsky, S. E., Fron, E., Rodríguez, H. B., Román, E. S., Scholes, G.D., Schweitzer, G., Valeur, B., Wirz, J., Pitfalls and limitations in the practical use of Förster's theory of resonance energy transfer, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7, 1444–1448
19. Demchenko, A. P., Introduction to Fluorescence Sensing, 2nd ed., Springer, USA, **2015**, 92–98
20. Li, C., Wang, L., Yang, C., Jiang, T., Imran, M., Ahmed, I., Xiaobc, M., Zhang, Y., Multi-dressing time delayed fourth- and sixth-order fluorescence processes in Pr³⁺:YSO, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 39449-39454
21. Lavogina, D., Enkvist, E., Uri, A., Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications, *ChemMedChem*, **2010**, 5, 23–34. Review
22. Enkvist, E., Vaasa, A., Kasari, M., Kriisa, M., Ivan, T., Ligi, K., Raidaru, G., Uri, A., Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, 6, 1052–1062
23. Enkvist, E., M., Kriisa, M., Roben, M., Kadak, G., Raidaru, G., Uri, A., Effect of the structure of adenosine mimic of bisubstrate-analog inhibitors on their activity towards basophilic protein kinases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 6098–6101
24. Chan W.C., White P.D., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, **2010**, 41–74
25. Vaasa, A., Lust, M., Terrin, A., Uri, A., Zaccolo, M., Small-molecule FRET probes for protein kinase activity monitoring in living cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 397, 750–755
26. Parring, A-M., Vähi, M., Käärik, E., Statistilise andmetöötuse algõpetus, Tartu Ülikooli Kirjastus, **1997**, 258–270
27. Seybold, P. G., White, W., External Heavy-Atom Effect on the Room-Temperature, *J. Phys. Chem. A.*, **1977**, 81, 2035–2040
28. Wilhelm, P., Lewandowski, B., Trapp, N., Wennemers, H., A crystal structure of an oligoproline PPII-helix, at last, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 15829–15832
29. Stryer, L., Haugland, R.P., Energy transfer: a spectroscopic ruler, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1967**, 58, 719–726
30. Hirschfeld, V., Paulsen, H., Hübner, C.G., The spectroscopic ruler revisited at 77 K, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15, 17664–17671
31. <http://scientificpolymer.com/technical-library/refractive-index-of-polymers-by-index/> (Viimati vaadatud: 22.05.2017)
32. Bergemann, K. J., Krasny, R., Forrest, S. R., Thermal properties of organic light-emitting diodes, *Org. Electron.*, **2012**, 13, 1565–1568

8. Lisad

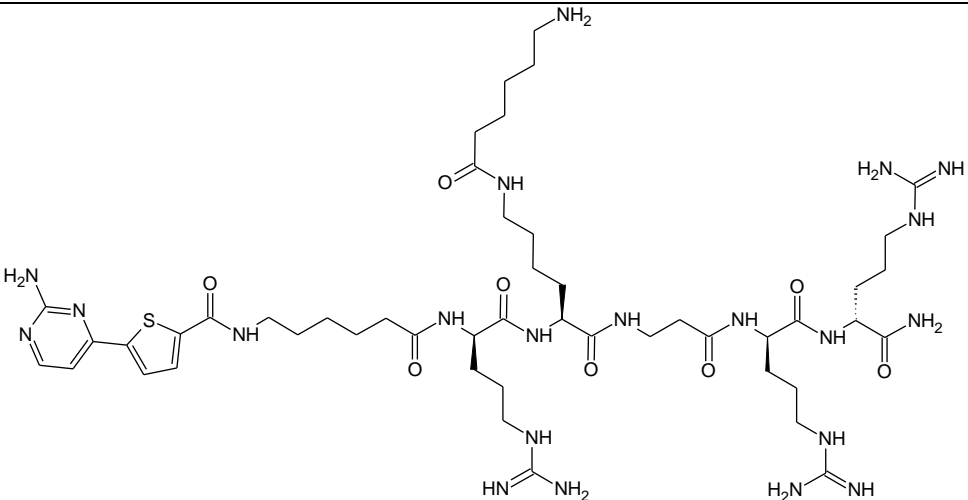
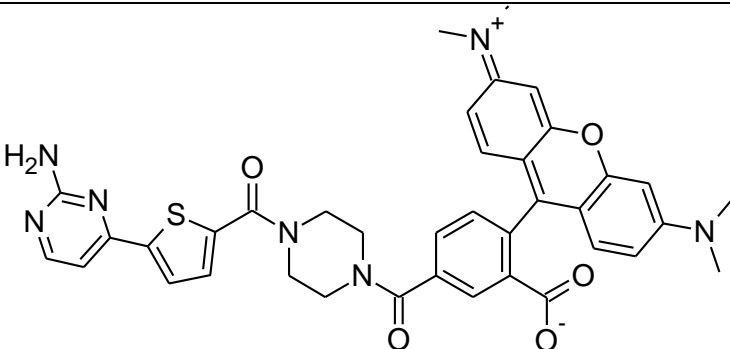
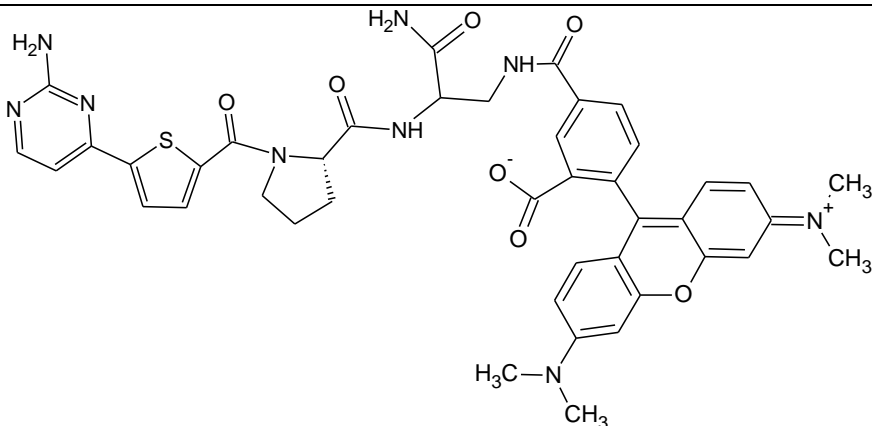
Lisa 1. ARC-Lum ühendite struktuurid koos lühenditega

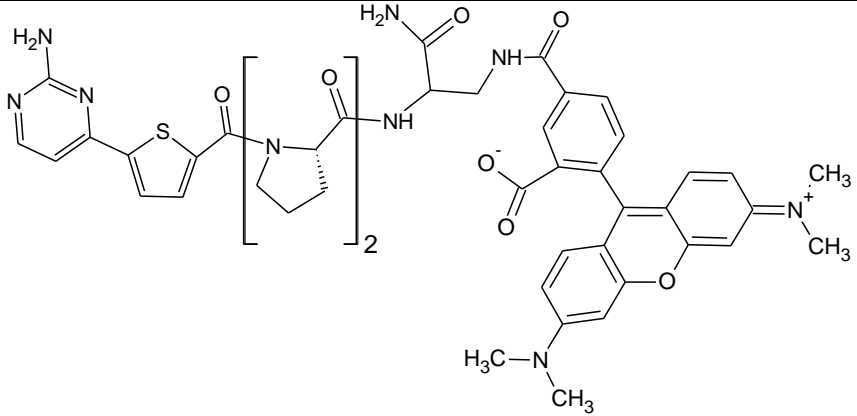
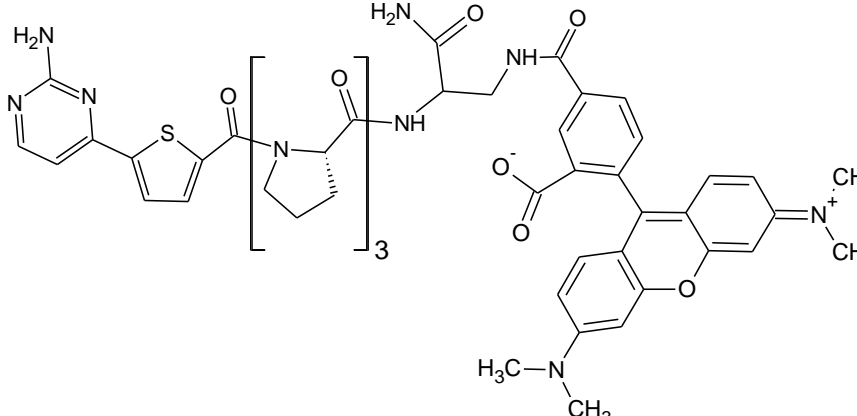
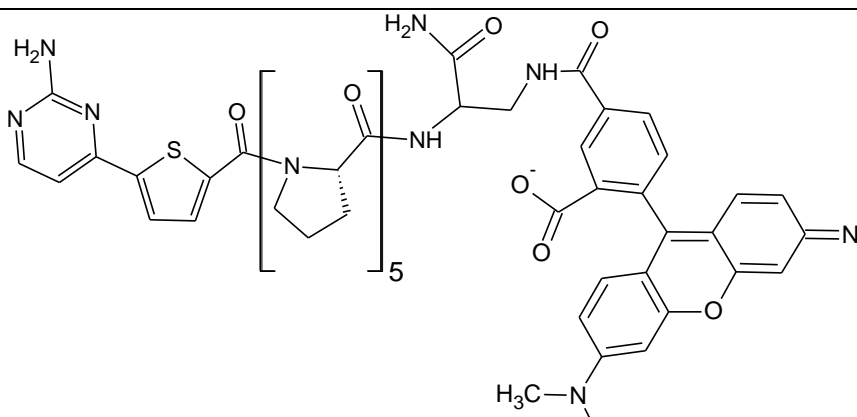
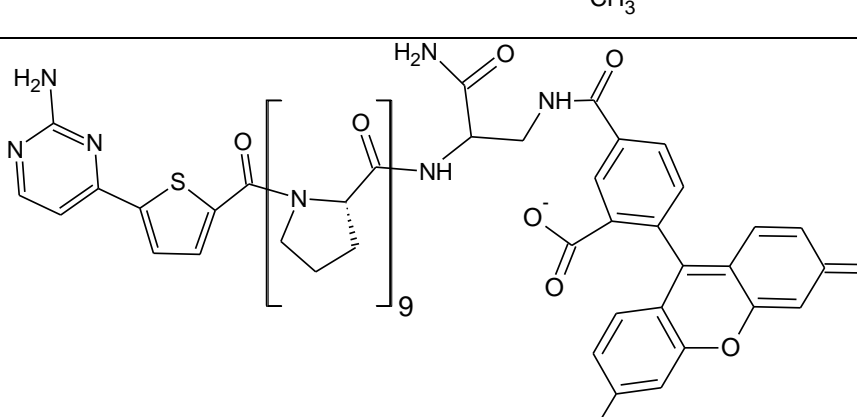
Lisa 2. Mikrotiiterplaadi mõõtesüvendisse ning polüstüreenklaasist alusele kantud proov

Lisa 3. ARC-Lum(Fluo) ühendite luminescentssignaali kustumiskõverad

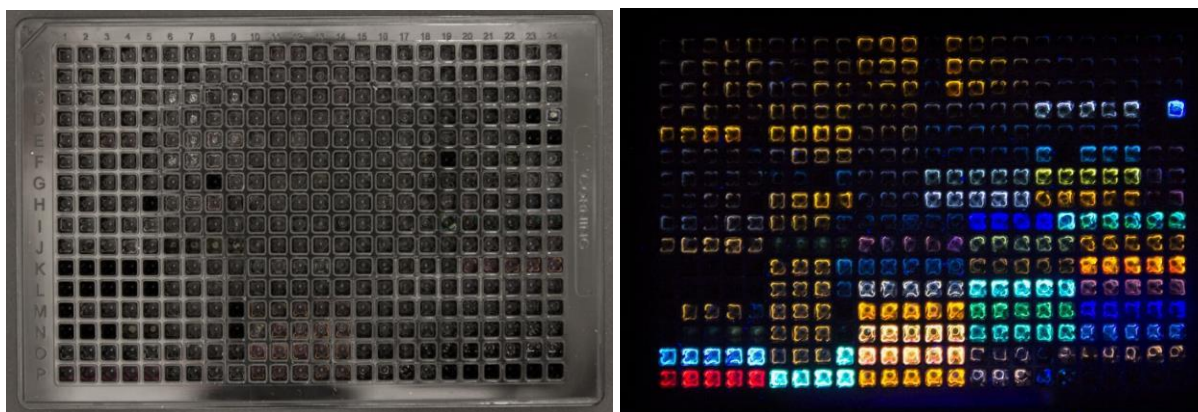
Lisa 4. ARC-Lum(Fluo) ühendite luminescentssignaali kustumise hajuvusdiagrammid

Lisa 1. ARC-Lum ühendite struktuurid koos lühenditega

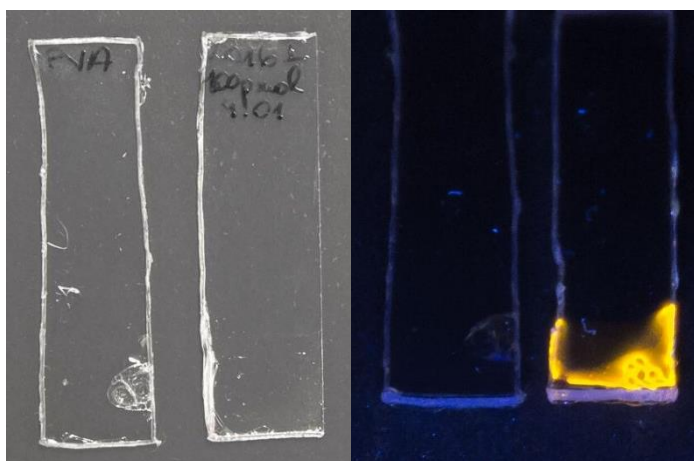
Kood	Struktuur
ARC-2007	
ARC-2024	
ARC-2021	

ARC-2022	 <p>Chemical structure of ARC-2022. It features a 2-aminopyrimidin-5-yl group attached to a thiophene ring, which is linked via a carbonyl group to a pyrrolidine ring. This pyrrolidine ring is part of a repeating unit with a subscript of 2. The repeating unit is connected to a side chain containing a primary amide, a secondary amide, and a carboxylate group. The side chain is further connected to a complex polycyclic aromatic system, specifically a 6,6'-bis(4-methoxyphenyl)-2,2'-biphenyl derivative, which is substituted with a trimethylammonium group (N⁺(CH₃)₃) and a dimethylamino group (N(CH₃)₂).</p>
ARC-2016	 <p>Chemical structure of ARC-2016. It is similar to ARC-2022, but the repeating unit of the pyrrolidine ring has a subscript of 3.</p>
ARC-2017	 <p>Chemical structure of ARC-2017. It is similar to ARC-2022, but the repeating unit of the pyrrolidine ring has a subscript of 5.</p>
ARC-2028	 <p>Chemical structure of ARC-2028. It is similar to ARC-2022, but the repeating unit of the pyrrolidine ring has a subscript of 9.</p>

Lisa 2. Proovid mikrotiiterplaadi mõõtesüvendites ja polüstüreenklaasist alusel

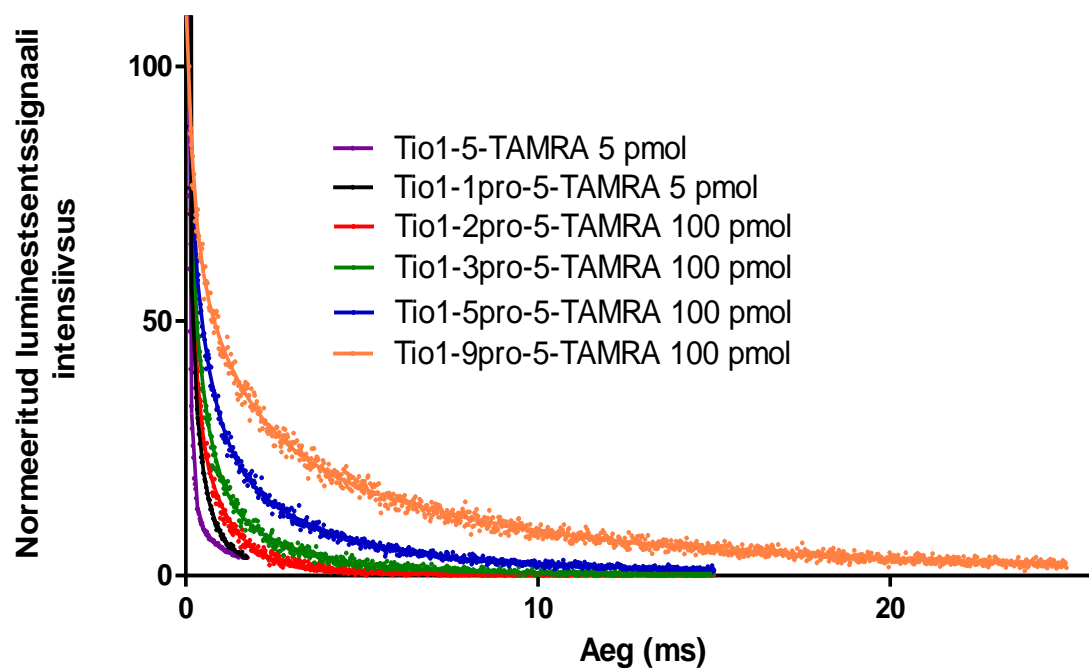


Vasakul pool mikrotiiterplaadi mõõtesüvikud koos proovidega nähtava valguse käes, paremal pool UV-lambi all (ergastatud 350 nm).

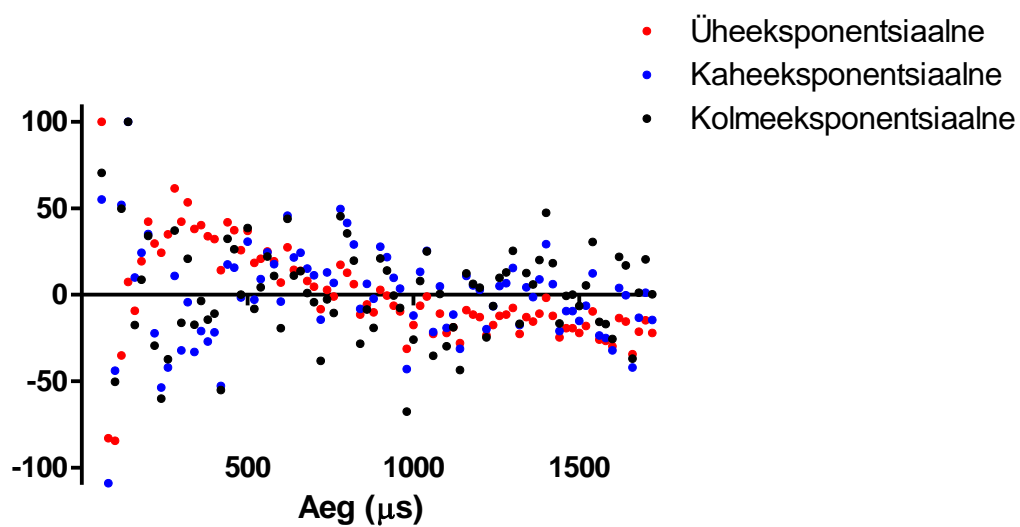


Vasakul pool polüstüreenklaasist alused. Pildil parem alus on ARC-2016 ning vasak alus 7 % PVA kile. Parempoolsel pildil samad proovid, aga UV lambi all (ergastatud 350 nm).

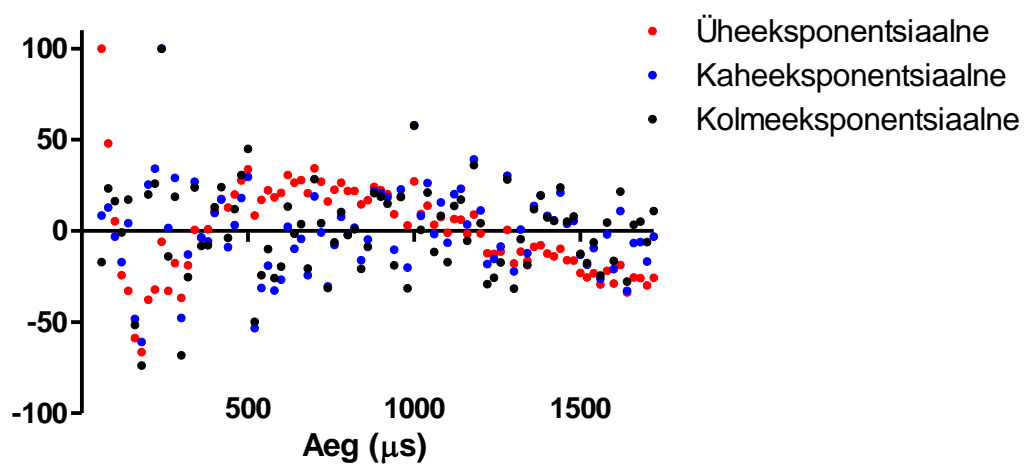
Lisa 3. ARC-Lum(Fluo) ühendite luminescentssignaali destruktuurade pikemas mõõtetaknas



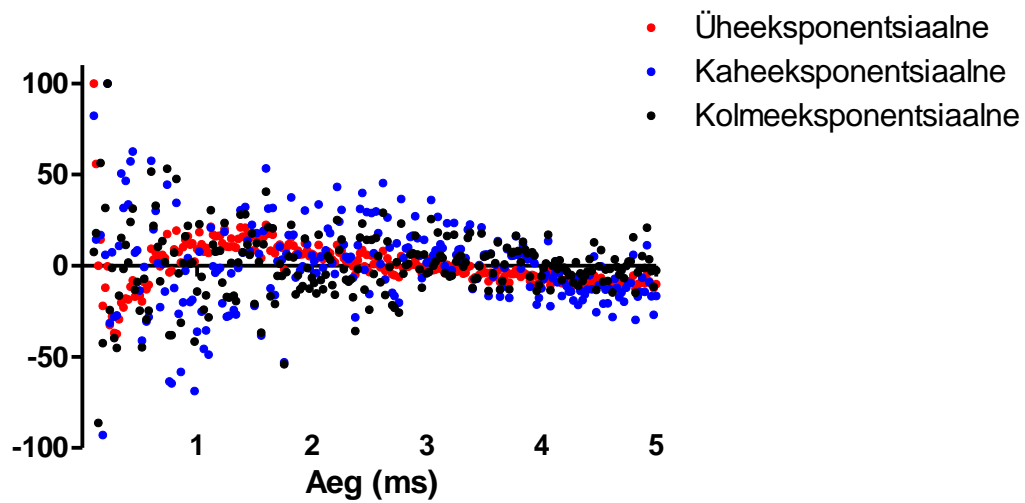
Lisa 4. ARC-Lum(Fluo) ühendite luminestsentssignaali kustumise hajuvusdiagrammid



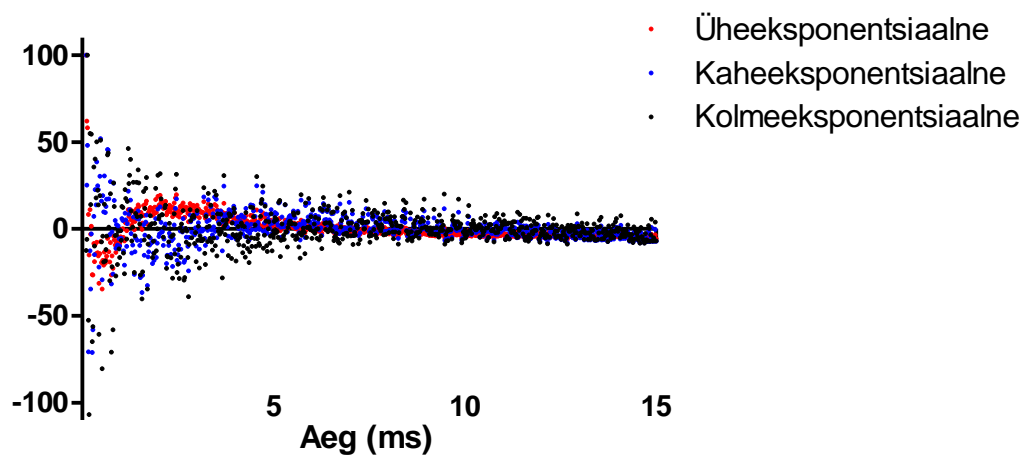
Tio1-5-TAMRA



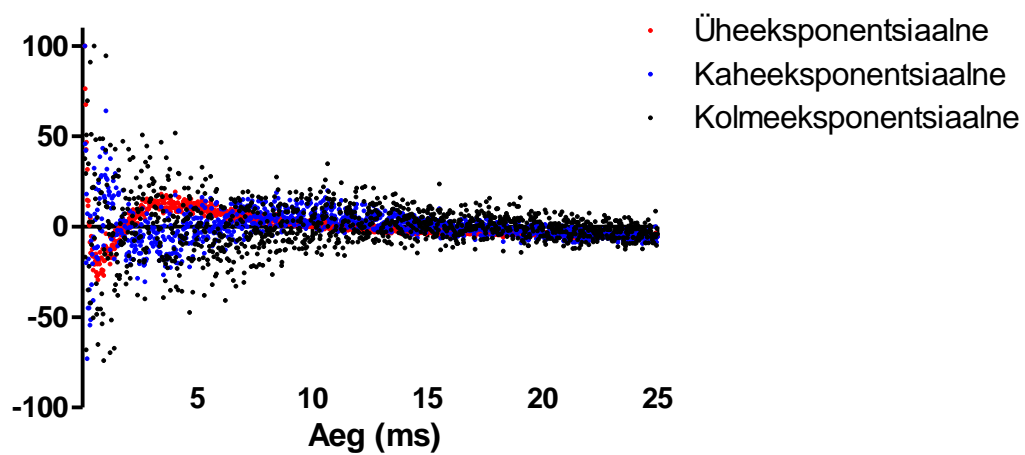
Tio1-1pro-5-TAMRA



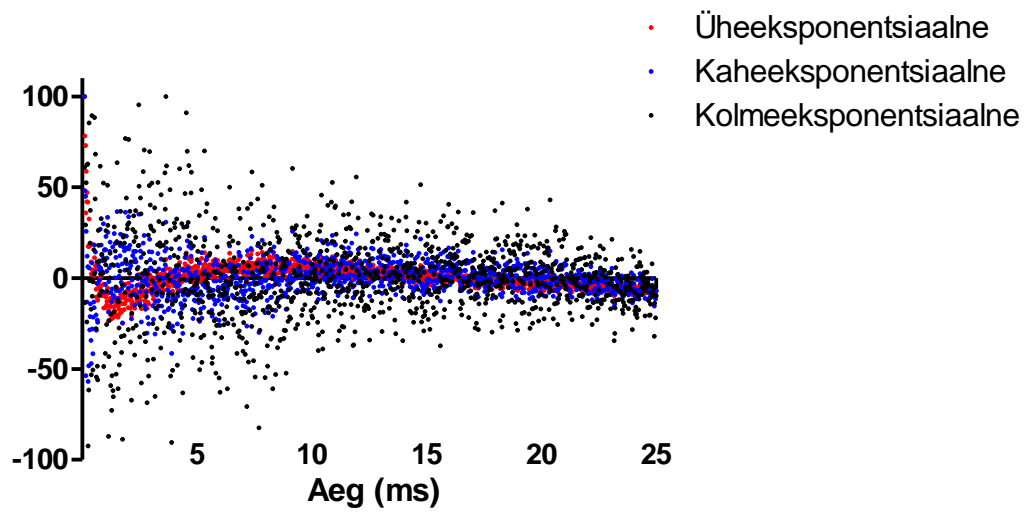
Tio1-2pro-5-TAMRA



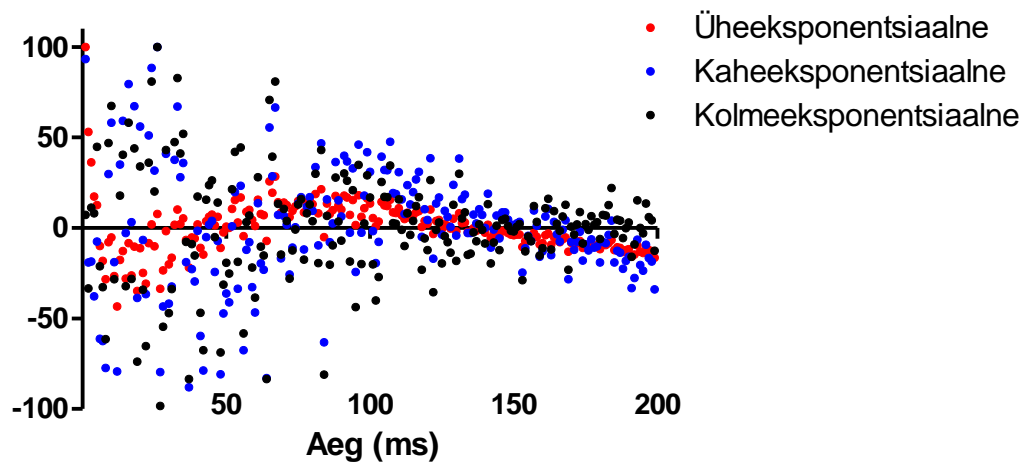
Tio1-3pro-5-TAMRA



Tio1-5pro-5-TAMRA



Tio1-9pro-5-TAMRA



Tio1

9. Infoleht

ARC-LUM ühendite fotoluminestsentsomaduste uurimine tahkes polümeermaatriksis

Magistritöö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum ühendite luminestsentsomadusi polüvinüülalkoholis, jätkuna bakalaureusetööle „Mudelainete süntees Försteri distantssi uurimiseks ARC-Lum(Fluo) sondides“. OLED-ite ning fosforestsentskiirgusel põhinevate sensorite areng on viimastel aastakümnetel olnud märgatav, seetõttu sooviti uurida, kas ARC-Lum ühendid sobiksid sellisteks rakendusteks. Selleks sünteesiti erineva doonor- ja aktseptorluminofoori vahelise distantssiga ARC-Lum(Fluo) ühendite seeria ja uuriti nende luminestsentssignaalide eluigasid PVA-s. Samuti võeti kasutusele uus mõõtesüsteem ning sellega kaasnevalt muudeti proovi ettevalmistuse meetodit. Lisaks teostati hulgaliselt paralleel- ja kordusmõõtmisi andmete korratavuse kontrollimiseks ja usaldusväärsuse tõstmiseks. Mõõdeti fosforestsentsi eluead ka neljale ARC-Lum(-) ühendile, mida varem polnud õnnestunud teha. Viimasena uuriti ARC-Lum(Fluo) kui ka ARC-Lum(-) ühendite luminestsentskiirguse temperatuuri sõltuvust ja fotostabiilsust.

Märksõnad: fosforestsentskiirgus, energia ülekanne, ARC, OLED

Luminescence properties of ARC-Lum probes in polyvinyl alcohol

The aim of the master's thesis was the examination of luminescence properties of ARC-Lum probes in polyvinyl alcohol (PVA) synthetic polymer to continue the research that was described in author's bachelor's thesis „Synthesis of model compounds for the study of Förster's radius in ARC-Lum(Fluo) probes“. The development of OLEDs and phosphorescence emission-based sensors have attracted considerable attention in recent years and therefore ARC-Lum compounds were studied to be used for these applications. ARC-Lum(Fluo) compounds possessing different distances between the donor and acceptor chromophores were synthesized and their luminescence lifetime was measured. A new measurement method and instrumental setup were introduced, which also required the introduction of a new sample preparation technology. Many parallel measurements were carried out to rise the credibility of the data. Phosphorescence lifetimes of four ARC-Lum(-) compounds were measured in PVA, which was not possible with the previous measuring method. Also the temperature dependence of the luminescence emission properties of ARC-Lum(Fluo) and ARC-Lum(-) probes were examined.

Keywords: phosphorescence, energy transfer, ARC, OLED

10.Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Joana Jõgela,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
ARC-Lum ühendite fotoluminestsentsomaduste uurimine tahkes polümeermaatriksis,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Erki Enkvist,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **22.05.2017**